

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

VARIABILIDAD DE *Leishmania (Leishmania) infantum* EN ESPAÑA


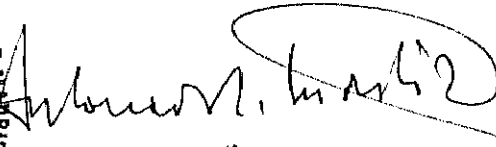
Memoria presentada por
MARIA ISABEL JIMÉNEZ ALONSO
para optar al Grado de Doctor en Farmacia

Madrid, Noviembre de 1994

D. ANTONIO R. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR
DEL DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE
FARMACIA DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: que la Licenciada en Farmacia M^a Isabel Jiménez Alonso ha realizado
bajo la dirección del Dr. D. Jorge Alvar Ezquerro la memoria titulada
"VARIABILIDAD DE *Leishmania (Leishmania) infantum* EN
ESPAÑA" para optar al grado de Doctor en Farmacia.

y para que así conste, expido y firmo el presente en Madrid 27 de Septiembre de
1994.

 
Fdo: D. Antonio R. Martínez Fernández
FACULTAD DE FARMACIA
DPTO. DE PARASITOLOGIA

A mi familia

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento a todos aquellos que de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo.

D. Jorge Alvar Ezquerro, director de este trabajo, me dió la oportunidad en su día para incorporarme a su equipo y puso su confianza en mí para la realización de este trabajo. Tengo que reconocer su dedicación y esfuerzo a lo largo de estos años. Sus consejos como director han sido extraordinariamente útiles.

D. A.R. Martínez-Fernández, catedrático y director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia, me inició en el campo de la Parasitología. No puedo olvidarme de mis compañeros de este Departamento con los que compartí varios años de trabajo.

Mi especial gratitud a D. Ricardo Molina Moreno, compañero y amigo por su paciencia y saber escuchar, él ha seguido muy de cerca este trabajo y los problemas que han surgido en estos años. Su estímulo ha sido para mí muy importante.

Estoy especialmente agradecida a mi amiga D^a Mercedes Martínez-Grueiro, por sus comentarios y sugerencias en la lectura del texto. Sus consejos y apoyo en los momentos más difíciles me ayudaron a seguir adelante.

A D^a Teresa Gárate por sus consejos y orientaciones.

Mirian Ferrer Dufol colaboró conmigo durante unos meses, para mí muy difíciles, en la realización de una de las partes experimentales del trabajo. Siempre le estaré agradecida.

He de agradecer a Emilia García su excelente asistencia técnica en el aislamiento de las cepas y a Margarita Bravo del Peso en la preparación de los medios de cultivos.

Los Dres Fernando Laguna, Rogelio López Vélez, Sabino Puente, Emilia Cercenado, Bartolomé Cabrer y Francisco Solís facilitaron el material biológico para su caracterización.

Al Dr. M. Tibayrenc director del laboratorio de "Génétique moléculaire des parasites et des vecteurs" del ORSTOM, Montpellier (Francia) con quien realicé el análisis de genética de poblaciones y la amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios.

Al Dr.G. Van Eys, Royal Tropical Institute, Amsterdam (Holanda) por proporcionarnos las sondas de ADN recombinante utilizadas en este trabajo.

Al Prof. D. Le Ray, Institute for Tropical Medicine "Prince Léopold", Antwerp (Bélgica) que nos proporcionó las cepas de algunos tripanosomátidos.

Angel del Pozo por su ayuda en la preparación del material fotográfico.

A Esperanza Pérez Pastrana, Ismael Santa-María y Amparo Vivo por su contribución en el trabajo de microscopía electrónica.

A Javier Moreno y Marta Ortiz quisiera agradecerles su ayuda desinteresada.

A todos mis compañeros del Servicio de Parasitología y en especial a los compañeros de laboratorio Carmen Cañavate, Beatriz Gutiérrez-Solar y Rafael Ortiz por su apoyo a lo largo de estos años. A Esperanza Rodríguez, Agustín Benito y Mar Vitutia he de agradecerles sus palabras de ánimo.

Agradezco al Instituto de Salud "Carlos III" la concesión de la Beca predoctoral que me ha permitido la realización de esta Tesis.

El Proyecto Avicena CEE AVI*CT92-0013 ha permitido parte de la financiación de este trabajo.

A mis padres y hermanos tengo que agradecerles su apoyo constante y su paciencia.

A mis amigos, quienes esperaban con ansiedad que este trabajo llegara a buen término. Su apoyo ha sido muy importante para mí.

Son muchas las personas que a lo largo de estos años han colaborado en este trabajo y quizá me haya olvidado de alguna, a todas ellas, gracias.

ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico
ADNc: ADN copia
ADNk: ADN de kinetoplasto
ADNg: ADN genómico
AO: Angola
at.: Atmósferas
B: Barcelona
BCN: Laboratorio de Parasitología. Facultad de Farmacia de Barcelona
BR: Brasil
BSA: Albúmina de suero bovino
BZ: Belize
Ci: Curios
cpm: Cuentas por minuto
DNAsa: Desoxirribonucleasa
DO: Densidad óptica
DZ: Argelia
EDTA: Etilendiaminotetracético
ES: España
ET: Etiopia
FR: Francia
IFLA: Invertebrado *Lutzomyia*
IN: India
IL: Israel
ITMAP: "Prince Léopold" Institute of Tropical Medicine. Protozoology Laboratory. Antwerp (Bélgica)
IQ: Iraq
Kb: Kilobases
LC: Leishmaniosis cutánea
LEM: Laboratoire d'Ecologie Médicale, Montpellier
LLM: Laboratorio de Referencia de Leishmaniosis de Majadahonda (Madrid)
LRC: Leishmaniosis Reference Center, Jerusalén
LV: Leishmaniosis visceral
M: Madrid
MAD: Zimodema establecido por el LLM
Mb: Megabases
MCAN: Mamífero cánido
MHOM: Mamífero hombre
MNYC: Mamífero *Nyctomys*
MON: Zimodema establecido por el LEM
pb: Pares de bases
RNA: Ácido ribonucleico
RNAsa: Ribonucleasa
SDS: Dodecil sulfato sódico
SU: Sudán
Taq: *Thermus aquaticus*
TN: Túnez
UI: Unidades internacionales

v: Voltios

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana

WR: Walter Read Army Institute of Research, Washington (USA)

	I
1.- INTRODUCCIÓN	1
1.1.- Género <i>Leishmania</i>	1
1.1.1.- Taxonomía	1
1.1.2.- Ciclo biológico	3
1.2.- El genoma de <i>Leishmania</i>	5
1.2.1.- Cromosomas	5
1.2.1.1.- Estructura de los cromosomas	6
1.2.1.2.- Ploidía	9
1.2.2.- Minisatélites	10
1.2.3.- ADN circular extracromosómico	10
1.2.4.- Kinetoplasto	12
1.2.4.1.- Maxicírculos	12
1.2.4.2.- Minicírculos	13
1.3.- Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad	15
1.4.- Métodos de caracterización del parásito	19
1.4.1.- Caracterización mediante isoenzimas	22
1.4.2.- Caracterización mediante sondas de ADN	26
1.4.2.1.- Sondas de ADN-k	26
1.4.2.2.- Sondas de ADN-g	30
1.4.2.3.- Sondas ribosomales	31
1.4.3.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)	33
1.5.- Leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea	36
1.5.1.- Leishmaniosis en España	40
1.6.- Leishmaniosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)	41
2.- OBJETIVOS	44
3.- MATERIAL Y MÉTODOS	45
3.1.- Material biológico	45
3.1.1.- Características de las cepas de referencia y aislados	45
3.1.2.- Aislamiento	46
3.1.3.- Cultivo en masa	47
3.1.4.- Congelación	48
3.1.5.- Descongelación	48
3.2.- Caracterización enzimática	54
3.2.1.- Sistemas enzimáticos	54

3.2.2.- Preparación de los geles	55
3.2.3.- Preparación de los extractos enzimáticos	56
3.2.4.- Electroforesis	56
3.2.5.- Revelado	57
3.2.6.- Interpretación de los resultados	58
3.3.- Caracterización mediante sondas de ADN	61
3.3.1.- Extracción de ADN de <i>Leishmania</i>	61
3.3.1.1.- Separación de ADNg y ADNk mediante gradiente de densidad en CsCl/EtBr	61
3.3.1.2.- Reactivos y soluciones necesarias para extracción de ADN	62
3.3.2.- Cuantificación de ADN	63
3.3.3.- Digestión de ADN-k y ADN-g con endonucleasas	64
3.3.4.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa	64
3.3.4.1.- Electroforesis de ADNg	64
3.3.4.2.- Electroforesis de ADNk	64
3.3.5.- Transferencia de ADN	65
3.3.5.1.- Transferencia de ADN por capilaridad según Southern (1975) ("Southern-Blot")	65
3.3.5.2.- Transferencia de ADN mediante vacío ("Slot-Blot")	66
3.3.6.- Caracterización mediante sondas de ADNk	66
3.3.6.1.- Obtención de fragmentos de ADNk	66
3.3.6.2.- Marcaje de ADNk con P ³²	67
3.3.6.3.- Hibridación con sondas de ADNk	67
3.3.7.- Caracterización mediante sondas de ADNg	68
3.3.7.1.- Purificación de fragmentos de ADN clonados	69
3.3.7.2.- Marcaje de los fragmentos de ADN recombinante con P ³²	70
3.3.7.3.- Hibridación con sondas de ADNg	70
3.4.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)	71
3.4.1.- Extracción de ADN	71
3.4.2.- Amplificación	72
3.4.3.- Electroforesis	72
3.4.4.- Interpretación de los resultados	72
3.5.- Análisis de los datos	73
3.5.1.- Determinación de las distancias genéticas	73
3.5.2.- Análisis de genética de poblaciones	74
3.5.2.1.- Pruebas de segregación	74
3.5.2.2.- Pruebas de recombinación	74

4.- RESULTADOS

	77
4.1.- Caracterización enzimática	77
4.1.1.- Caracterización enzimática de los aislados caninos	77
4.1.2.- Caracterización enzimática de los aislados humanos	84
4.1.2.1.- Variabilidad	84
4.1.2.2.- Relaciones filogenéticas: Dendograma	102
4.1.2.3.- Análisis de genética de poblaciones	102
4.2.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)	104
4.2.1.- Variabilidad	104
4.2.2.- Relaciones filogenéticas: Dendograma	110
4.2.3.- Análisis de genética de poblaciones	111
4.3.- Caracterización mediante sondas de ADN de aislados humanos	113
4.3.1.- Caracterización mediante sondas de ADNg	113
4.3.1.1.- Caracterización de aislados humanos de <i>Leishmania</i> con la sonda 7-059	113
4.3.1.2.- Caracterización de aislados humanos de <i>Leishmania</i> con la sonda pDK20	117
4.4.- Caracterización del aislado humano ANA	122
4.4.1.- Caracterización mediante sondas de ADN	122
4.4.1.1.- Caracterización con las sondas de ADNg 7-059, pDK20 y pDK10	123
4.4.1.2.- Caracterización con la sonda de ADNk k-1/307	123
4.4.1.3.- Homología del ADNg y ADNk del aislado ANA con otras especies de <i>Leishmania</i> y otros tripanosomátidos	124
4.4.2.- Caracterización enzimática	135
4.5.- Caracterización del aislado humano de ANGOLA	143
4.5.1.- Caracterización mediante sondas de ADN	143
4.5.1.1.- Caracterización con la sonda de ADNk k-1/307	143
4.5.1.2.- Caracterización con las sondas de ADNg 7-059, pDK20 y pDK10	143
4.5.2.- Caracterización enzimática	149

	IV
5.- DISCUSIÓN	154
5.1.- Caracterización enzimática	154
5.2.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)	160
5.3.- Caracterización mediante sondas de ADN	163
5.4.- Caracterización del aislado ANA	165
5.5.- Caracterización del aislado humano de Angola	170
6.- CONCLUSIONES	177
7.- BIBLIOGRAFÍA	179
8.- ANEXO	226

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.- Género *Leishmania*

1.1.1.- Taxonomía

Leishmania Ross, 1903 es un protozoo flagelado perteneciente al orden Kinetoplastida y la familia Trypanosomatidae (Levine *et al.*, 1980). En 1987 Lainson y Shaw publicaron una versión mejorada de la clasificación del género *Leishmania*, basada fundamentalmente en criterios extrínsecos, eco-epidemiológicos y de taxonomía Linneana, pero que no respondía al origen mono o polifilético del mismo. Así, dentro del género *Leishmania* se describen dos subgéneros en función del lugar de reproducción en el tracto digestivo del vector (Lainson y Shaw, 1979, 1987): subgénero *Leishmania* descrito por Safjanova (1982) y que hace referencia al desarrollo suprapilórico de los flagelados y subgénero *Viannia* descrito por Lainson y Shaw (1987), de multiplicación peripilórica. Las leishmanias de reptiles fueron retiradas del género *Leishmania*, para ser incluidas en el género *Sauroleishmania* (Ranque, 1973).

Hasta el momento, se han descrito 27 especies, agrupadas en 15 complejos filogenéticos (Lainson y Shaw, 1972, 1986, 1987; Rioux *et al.*, 1990a; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993a) y, gracias a las técnicas bioquímicas y un análisis cladístico, se ha podido confirmar la clasificación de Lainson y Shaw (1987) pudiéndose establecer la hipótesis del origen monofilético del género *Leishmania* (Thomaz-Soccol *et al.*, 1993b).

En la Figura 1 se muestra un esquema con la taxonomía actualizada del género *Leishmania*, basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (Rioux *et al.*, 1990a; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993a; Dedet, 1993).

Familia	Género	Subgénero	Complejo	Especie
T Y P A N S O M A T I D A E	Endotrypanum		--L. donovani.....	L. donovani L. archibaldi
			--L. infantum.....	L. infantum (syn. L. chagasi)
	Phytomonas		--L. tropica.....	L. tropica L. killicki
			--L. major.....	L. major
	Trypanosoma		--L. gerbilli.....	L. gerbilli
		Leishmania	--L. arabica.....	L. arabica
			--L. aethiopica	L.aethiopica
	Sauroleishmania		--L. mexicana.....	L. mexicana (syn. L. pifanoi)
			--L. amazonensis.....	L. amazonensis (syn. L. garnhami) L. aristidesi
	Leishmania		--L. enrietti.....	L. enrietti
			--L. hertigi.....	L. hertigi L. deanei
			L. venezuelensis *
	Blastocrithidia			
	Herpetomonas		--L. braziliensis.....	L. braziliensis L. peruviana
			--L. guyanensis.....	L. guyanensis L. panamensis L. shawi
	Leptomonas	Viannia	--L. lainsoni.....	L. lainsoni
			--L. naiffi.....	L. naiffi
	Crithidia		L. colombiensis * L. equatorensis *

Figura 1.- Clasificación del género *Leishmania* basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (Rioux *et al.*, 1990a; Thomaz-Soccol *et al.*, 1993a; Dedet, 1993).

* Especies que permanecen sin incluir en ningún complejo.

1.1.2.- Ciclo biológico

El ciclo biológico de *Leishmania* tiene lugar en dos tipos de hospedadores: en uno invertebrado que comprende numerosas especies de los géneros *Phlebotomus* en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en el Nuevo Mundo, ambos pertenecientes a la familia Psychodidae, y en un hospedador vertebrado que incluye una gran variedad de géneros.

El parásito adquiere a lo largo del ciclo biológico formas bien diferenciadas, una móvil y flagelada en el hospedador invertebrado, y la otra inmóvil intracelular y no flagelada, denominada amastigote, en el hospedador vertebrado (ver revisiones de Molyneux *et al.*, 1986 y Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

Cuando el vector (hospedador invertebrado) ingiere sangre del hospedador vertebrado, inocula los promastigotes infectivos, llamados metacíclicos, que penetran en los macrófagos de la piel, vísceras y membranas mucosas, gracias a su unión con los receptores CR1 (Mallinson y Coombs, 1989) y CR3 del complemento (Russell y Wright, 1988), el receptor manosa-fucosa (Russell y Wilhelm, 1986) y el receptor del fibrinógeno (Rizvi *et al.*, 1988), donde se transforman en amastigotes, proceso que tiene lugar entre 1 a 4h más tarde. La multiplicación de los amastigotes en el interior de la vacuola parasitófora de los macrófagos es mitótica y se produce por fisión binaria. Algunos aspectos generales del proceso de unión *Leishmania*-macrofago, así como los mecanismos de evasión de la respuesta inmune, han sido revisados recientemente por Rivas *et al.* (1993), Scott y Sher (1993) y Fernández *et al.* (1993).

Los macrófagos cargados de amastigotes pueden volver a ser ingeridos por el vector en el transcurso de una nueva picadura, son lisados y liberan los amastigotes que se transforman en promastigotes en el tracto digestivo. Estos promastigotes sufren transformaciones complejas y dan lugar a formas características aún no bien conocidas, que se conocen con los nombres de formas "paramastigotes", "haptomonas" y "neptomonas", para dar lugar a los promastigotes metacíclicos, que son los infectivos para el hospedador vertebrado (ver revisiones de Sacks, 1989 y Killick-Kendrick, 1990, 1991). Los parásitos pueden ser aislados del hospedador vertebrado a partir de órganos o lesiones infectadas o del hospedador invertebrado infectado y cultivarse en una gran variedad de medios de cultivo (ver Chang y Hendricks, 1985).

En la Figura 2 se muestra un esquema detallado del ciclo biológico (modificado de Chang *et al.*, 1985).

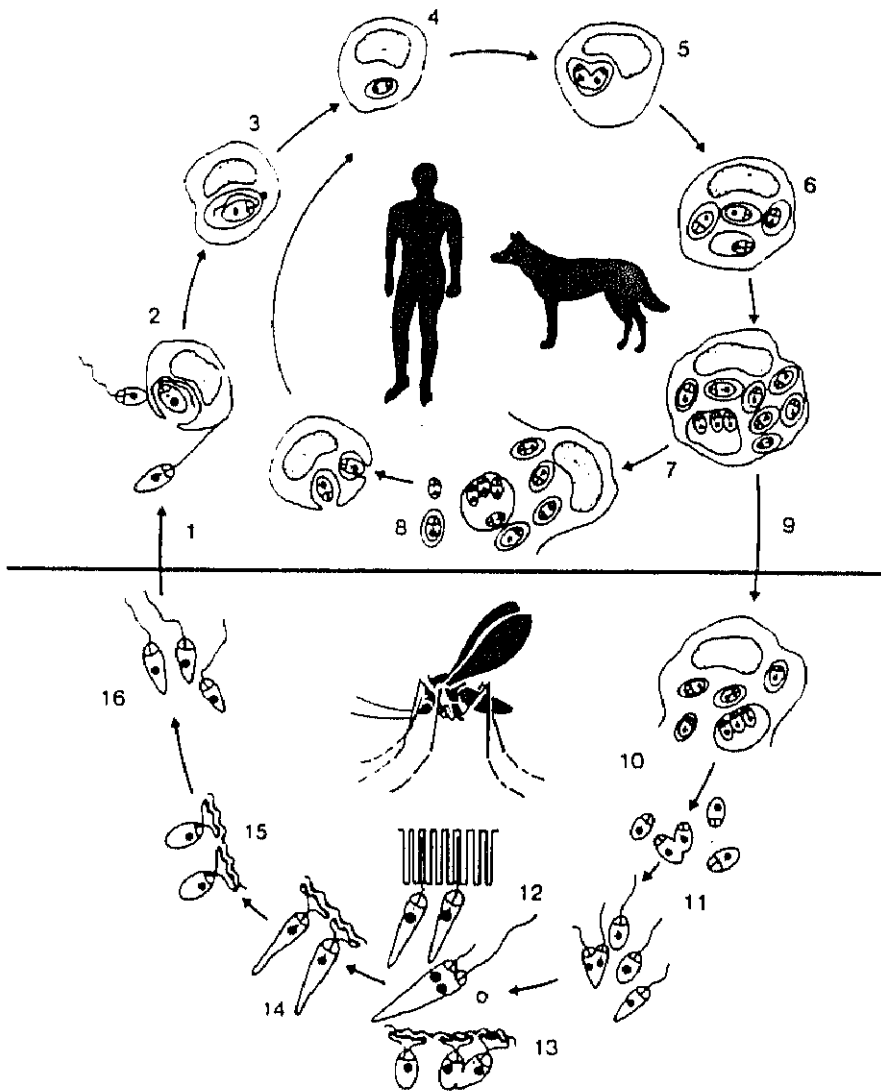


Figura 2 .- Ciclo de *Leishmania* spp. en los hospedadores vertebrado e invertebrado (modificado de Chang *et al.*, 1985). 1.- Penetración de promastigotes metacíclicos en el hospedador vertebrado, a través de la piel por la picadura de un flebotomo infectado; 2.- Fijación de los promastigotes al macrófago y posterior fagocitación; 3.- Fusión del fagosoma con el lisosoma; 4.- Diferenciación del promastigote en amastigote dentro del fagolisosoma del macrófago infectado; 5.- Multiplicación del amastigote en la vacuola parasitófora; 6.- Multiplicación intravacuolar de amastigotes; 7.- Ruptura del macrófago y liberación de amastigotes; 8.- Fagocitosis de los amastigotes liberados por otros macrófagos; 9.- Ingestión de macrófagos parásitados por el flebotomo al ingerir sangre de un hospedador vertebrado infectado; 10.- Ruptura del macrófago y liberación de los amastigotes en el estómago del flebotomo; 11.- Multiplicación de amastigotes y diferenciación en promastigotes; 12.- Multiplicación de los promastigotes (denominados neptomonas en algunas especies) en el tracto digestivo e inserción de los flagelos entre los microvellosidades del endotelio digestivo; 13.- Multiplicación de promastigotes del subgénero *Viannia* en el intestino posterior del flebotomo y diferenciación en paramastigotes, con los flagelos ensanchados en forma de disco, fijándose a la cutícula mediante hemidesmosomas; 14.- Migración de promastigotes hacia el intestino anterior como haptomonas, con los flagelos unidos a la cutícula del tracto digestivo; 15.- Localización de los paramastigotes con los flagelos unidos a la cutícula del intestino anterior; 16.- Promastigotes metacíclicos, muy móviles en la probóscide o en las inmediaciones de la válvula estomodeal del flebotomo.

1.2.- El genoma de *Leishmania*

Los protozoos pertenecientes al orden Kinetoplastida presentan un ADN genómico (ADNg) localizado en el núcleo celular, encargado de la replicación del parásito, y un ADN extracromosómico situado en la única mitocondria, que se replica independientemente, conocido como ADN del kinetoplasto (ADNk) (Simpson y Braly, 1970; Simpson y da Silva, 1971; Simpson *et al.*, 1980). También se han encontrado partículas semejantes a virus (VLPs) situadas en el citoplasma de promastigotes de *Leishmania (Leishmania) hertigi* que no tienen efecto ni en el crecimiento ni en la multiplicación del parásito (Molyneux, 1974), así como ARN virales en *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Tarr *et al.*, 1988) y *Leishmania (V.) guyanensis* (Chung *et al.*, 1994) que han sido incluidos en el género ARN viral 1 de *Leishmania* (LRV1) de la familia Totiviridae. La organización molecular de algunos de estos LRV1 ha sido ya estudiada (Stuart *et al.*, 1992; Scheffter *et al.*, 1994).

El tamaño del genoma de *Leishmania* varía con las especies, estando comprendido entre 10^7 - 10^8 pb de ADN. Así, el genoma de *L. (V.) braziliensis* es de $24,2 \times 10^7$ pb y el de *L. (L.) donovani* de $10,5 \times 10^7$ pb (Villalba y Ramirez, 1982), mientras que el de *L. (L.) mexicana* tiene un tamaño de $1,34 \times 10^8$ pb (Galindo y Ramirez-Ochoa, 1989).

El ADNk puede ser separado del ADNg por centrifugación en gradiente de densidad de cloruro de cesio/bromuro de etidio (Simpson y da Silva, 1971). Dependiendo de la especie, la densidad puede variar desde 1,714 a 1,720 g/ml para la banda de ADNg y desde 1,688 a 1,707 g/ml para la de ADNk (Chance *et al.*, 1974).

1.2.1.- Cromosomas

El material genético de los protozoos del Orden Kinetoplastida está organizado en cromosomas que, al no condensarse en ninguna fase del ciclo mitótico (Vickerman y Preston, 1970), no pueden ser visualizados con el microscopio óptico, lo que impide su análisis citogenético convencional.

Este inconveniente se pudo soslayar en la década de los años 80 con el desarrollo de la electroforesis en campo pulsado (PFGE) (Schwartz y Cantor, 1984; Gibson, 1985) y sus variantes: electroforesis ortogonal en campos alternos (OFAGE) (Carle y Olson, 1984, 1985; Ziegler *et al.*, 1987), electroforesis transversal en campos alternos (TAFE) (Gardiner

et al., 1986), electroforesis en campos homogéneos (CHEF), que proporciona patrones de bandas rectas facilitando así la hibridación y los análisis densitométricos (Chu *et al.*, 1986), así como de la electroforesis en campos homogéneos que se invierten periódicamente (FIGE) (Carle *et al.*, 1986; Dawkins *et al.*, 1987) y electroforesis rotatoria (RGE) (Southern *et al.*, 1987), que permiten el fraccionamiento en un gel de agarosa de grandes moléculas de ADN (de hasta 2000 kb). Básicamente todas estas técnicas hacen posible la separación de macromoléculas de ADN de 250 a 2600 kb (ver revisiones de Dawkins, 1987, 1989 y Bustamante *et al.*, 1993), lo que ha permitido el estudio de la estructura y organización cromosómica en *Leishmania* (ver revision de Bastien *et al.*, 1992b). De este modo se han podido esclarecer algunas de las incógnitas sobre la biología de este protozoo, tales como hasta qué punto el cariotipo se conserva durante la especiación, la existencia o no de reproducción sexual, determinación del número de copias de cada cromosoma o los posibles mecanismos para generar polimorfismo en el tamaño de los mismos.

1.2.1.1.- Estructura de los cromosomas

Se ha demostrado que existe un alto grado de plasticidad en el genoma de *L. (L.) major* (Giannini *et al.*, 1986; Spithill y Samaras, 1987; Massamba, 1990), *L. (L.) donovani* (Comeau *et al.*, 1986; Samaras y Spithill, 1987; Bishop y Miles, 1987, 1989; Bishop y Akinsehina, 1989; Bishop, 1990), *L. (L.) infantum* (Pagès *et al.*, 1989; Bastien *et al.*, 1990a,b; Gutiérrez-Solar *et al.*, 1990), *Sauroleishmania tarentolae* (Gómez-Eichelmann *et al.*, 1988) y los complejos de *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) mexicana* (Giannini *et al.*, 1986; Scholler *et al.*, 1986; Dujardin *et al.*, 1989, 1993a; Stuart *et al.*, 1989, Stuart, 1991; Eresh *et al.*, 1993). Para cada una de estas especies, los aislados individuales tienen cariotipos únicos a pesar de tener una gran proporción de cromosomas homólogos en tamaño.

Van der Ploeg *et al.* (1984) fueron los primeros en utilizar PFGE para separar los cromosomas de *Leishmania* y protozoos parásitos relacionados, demostrando que las variaciones en el tamaño y distribución de los cromosomas de genes seleccionados (mini-exon, α y β tubulina y genes ribosomales) no están altamente conservados entre diferentes flagelados del Orden Kinetoplastida. Según estos autores *L. (L.) tropica* contiene más de

20 cromosomas de más de 700 kb. Los genes de la α -tubulina y β -tubulina estarían localizados en dos tipos de cromosomas, unos de más de 2000 kb y otros de menos de 2000 kb, mientras que en el género *Trypanosoma* estos mismos genes estarían situados en unas especies en cromosomas de más de 2000 kb y en otras en cromosomas de menos de 2000 kb, lo que explicaría el diferente nivel de conservación.

Spithill y Samaras (1985), gracias a la técnica de PFGE, detectan en un clon de la cepa de *L. (L.) major*, LRC-L137/7/V121, 17 cromosomas divididos por su tamaño en dos grupos: 12 cromosomas de 400-1500 kb y 5 cromosomas de 2000-4000 kb. Así mismo, estudian la distribución de los genes de la α y β -tubulina en esta misma especie. Los genes de la α -tubulina se encuentran situados en un mismo locus (cromosoma 7), mientras que existen múltiples loci para la familia de genes de la β -tubulina (cromosomas 6, 10, 16 y 17). Posteriormente, estos mismos autores observan hasta un total de 23 cromosomas en esta misma cepa (Spithill y Samaras, 1987).

Bishop y Miles (1987) efectúan el fraccionamiento de los cromosomas de *L. (L.) donovani* mediante OFAGE lo que les permite diferenciar en esta especie 22 cromosomas. Las especies *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi* presentaron cariotipos diferentes. En un aislado de origen africano, MHOM/ET/67/HU3, observan un minicromosoma de 270 kb, no homólogo con los minicromosomas de ninguno de los aislados de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* utilizados en el estudio.

No sólo se ha encontrado polimorfismo en el tamaño de los cromosomas, si no también en el número y la intensidad con la que se tiñen con bromuro de etidio las bandas cromosómicas. Bastien *et al.* (1990a) aprecian un elevado polimorfismo en el cariotipo de cepas de *L. (L.) infantum* pertenecientes a diferentes zimodemas, así como en 12 cepas del zimodema 1 (MON-1). El polimorfismo afectó mayoritariamente al tamaño de las bandas cromosómicas, pero también al número (entre 23 y 31 cromosomas). Cuando analizan el cariotipo de 36 clones derivados de 8 cepas de *L. (L.) infantum* observan un polimorfismo interclonal dentro de cada cepa que afectó sólo a una o dos bandas cromosómicas. El 50% de los clones presentaron polimorfismo en el cariotipo, expresado principalmente por la presencia de un cromosoma adicional o modificaciones en el tamaño de los cromosomas. Cuando vuelven a clonar uno de los clones, observan también cierto grado de polimorfismo pero mucho menos frecuente (1/15), lo que podría indicar que durante el proceso de clonaje podrían tener lugar reagrupamientos de los cromosomas. Estas variaciones entre

clones implicaría una estructura en "mosaico", con individuos distintos que poseen versiones diferentes en tamaño del mismo cromosoma (Bastien *et al.*, 1990b).

Por otro lado, también se han observado patrones de cariotipo conservados (Giannini *et al.*, 1990; Lighthall y Giannini, 1992).

Tavares *et al.* (1992) estudian el cariotipo de 20 especies de *Leishmania* incluidas en diferentes complejos mediante CHEF detectando claras diferencias en la localización de los genes de la tubulina, entre especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo.

Los patrones de hibridación con sondas cromosómicas ha permitido agrupar a aislados de *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* en grupos discretos o cariodemas, facilitando su separación (Dujardin *et al.*, 1993a,b).

Blaineau *et al.* (1992a) analizan el cariotipo de 22 cepas de *L. (L.) infantum* pertenecientes a los zimodemas dermatropos MON-11, MON-29 y MON-33, originarias del mismo foco biogeográfico. Todas las cepas presentaron un cariotipo estrechamente relacionado que contrasta con el polimorfismo observado entre otras cepas cutáneas y viscerales aisladas en el mismo foco, todas ellas pertenecientes al zimodema 1 (MON-1) (Bastien *et al.*, 1990a,b; Blaineau *et al.*, 1990,1991).

El cariotipo de cada especie de *Leishmania* estaría representado por un grupo básico de cromosomas altamente conservados y un juego de cromosomas variables únicos para cada aislado, hipótesis que es confirmada por los datos obtenidos en el estudio del cariotipo de cinco aislados de *L. (L.) major* (Giannini, 1989; Giannini *et al.*, 1990).

El conocimiento de los mecanismos de origen del polimorfismo en el cariotipo podrían revelar fenómenos primitivos de dinámica del genoma, difíciles de poner en evidencia en los eucariotas superiores (Bastien, 1990c). La plasticidad en el genoma de *Leishmania* se podría producir como resultado del reagrupamiento de los cromosomas a través de amplificaciones y deleciones de secuencias repetidas en regiones subteloméricas (Iovannisci y Beverley, 1989; Bastien, 1990c)

La evolución de los cromosomas podría estar influenciada por diferentes presiones selectivas que operan en las diferentes especies de *Leishmania*. Por otro lado, la plasticidad de los cromosomas podría estar limitada por el modo de reproducción dentro de las especies. Si hubiera reproducción sexual, se favorecería la unión entre grupos de cromosomas entre todos los individuos de una población y, por lo tanto, existiría una elevada conservación del cariotipo. Si por el contrario, la reproducción fuera de tipo clonal

en *Leishmania* (Tibayrenc *et al.*, 1991; Tibayrenc, 1993), se produciría una elevada divergencia en los cariotipos (Lighthall y Giannini, 1992).

1.2.1.2. - Ploidía

El conocimiento de la ploidía de un organismo es un requisito imprescindible para comprender su genética. La segregación alélica, recombinación entre loci y reagrupamiento de cromosomas homólogos da como resultado que un organismo sea haploide, diploide o poliploide (Tait y Turner, 1990).

La ploidía en *Leishmania* es incierta y aunque la tendencia actual es considerar a este protozoo como un organismo diploide, lo que implicaría la existencia de un doble juego de cromosomas ($2n$), no existen muchos trabajos que apoyen esta hipótesis. Por el contrario, otros autores consideran a *Leishmania* como un protozoo haploide, del que existen un mínimo de cepas con uno o más cromosomas disómicos o polisómicos (aneuploidía).

Las primeras informaciones acerca de la ploidia de *Leishmania* se obtuvieron gracias al análisis enzimático (Maazoun *et al.*, 1981a; Le Blancq *et al.*, 1983). Kelly *et al.* (1991), describen un posible híbrido natural entre *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica*, que fue heterocigótico para cuatro sistemas enzimáticos (GPI, MPI, 6-PGD y ES).

La presencia de dos versiones distintas en el tamaño del mismo cromosoma, en varios clones "hermanos" de *L. (L.) infantum*, sustenta la hipótesis de que estos cromosomas son mínimamente diploides (Bastien *et al.*, 1990b).

En *L. (L.) major* se ha demostrado que el cromosoma II que porta el gen que codifica el mini-exón (Bernards *et al.*, 1983; Iovannisci y Beverley, 1989), y el cromosoma V que lleva el gen que codifica la timidilato sintetasa dihidrofolato reductasa (TS-DHFR) (Beverley, 1988; Cruz y Beverley, 1990) son mínimamente diploides. Así mismo, hay evidencia de que el locus de la adenina fosforribosil transferasa en *L. (L.) donovani* es diploide (Iovannisci *et al.*, 1984; Ullman *et al.*, 1989).

Los estudios del cariotipo de *L. (L.) mexicana* mediante CHEF han revelado que esta especie es diploide para muchos cromosomas (Galindo y Ramírez, 1989; Ramírez y Galindo, 1990).

Blaineau *et al.* (1991) intentan clarificar el polimorfismo encontrado en el cariotipo de

Leishmania, mediante el estudio de los cromosomas de tamaño menor de cinco clones de *L. (L.) infantum* con sondas específicas de ADN. Uno de los clones, (LEM1284), presentó dos versiones diferentes en tamaño de cada uno de los tres minicromosomas. Así mismo, demuestran que en el polimorfismo del cromosoma I de varias cepas de *L. (L.) infantum* está implicada una región subtelomérica que comprende secuencias repetidas. De este estudio se desprende que *Leishmania* es "mínimamente" diploide, al menos para los tres cromosomas estudiados. Por el contrario, existe evidencia de trisomía y polisomía en algunos cromosomas (Bastien *et al.*, 1990a).

1.2.2.- Minisatélites

Las secuencias de ADN denominadas "minisatélites" están presentes en el genoma de la mayoría de los eucariotas y recientemente se han puesto de manifiesto en *Leishmania* (Macedo *et al.*, 1992). Estos minisatélites están constituidos por unidades repetidas en tándem de 15 a 40 pb y generan un polimorfismo intraespecífico o "DNA fingerprints", siendo su análisis esencial en estudios de genética de poblaciones (Jeffreys *et al.*, 1985).

No existen muchos estudios sobre estas secuencias en *Leishmania*, pero su valor en la caracterización e identificación de especies y cepas de *Leishmania* del Nuevo Mundo ha sido estudiado por Macedo *et al.* (1992). La frecuencia y distribución de varios minisatélites en el genoma de *Leishmania* ha demostrado un polimorfismo alélico superior al obtenido con el análisis enzimático (Rossi *et al.*, 1994).

1.2.3.- ADN circular extracromosómico

La presencia de elementos genéticos circulares, bandas de ADN de 30-200 kb, como resultado de un proceso de amplificación del genoma en una gran variedad de protozoos parásitos, ha despertado recientemente un gran interés. En *Leishmania* se han identificado seis ADN circulares la mayoría en aislados resistentes a la acción de agentes selectivos como el metotrexato, arsenito sódico y tunicamicina aunque también se han encontrado en aislados no resistentes (ver revisiones de Stuart, 1991 y Beverley, 1991).

El ADN circular más estudiado es el ADN R, de 30 kb, que aparece en aislados de *Leishmania* resistentes a los inhibidores de la dihidrofolato reductasa (DHFR) o timidilato

sintetasa (TS) (Coderre *et al.*, 1983; Beverley *et al.*, 1984; Beverley, 1988; Garvey y Santi, 1986; Hightower *et al.*, 1987, 1988; Kapler *et al.*, 1990). El ADN-H tiene un tamaño comprendido entre 68-170 kbs, y se encuentra tanto en aislados seleccionados para resistencia a metotrexato (MTX) y primaquina, entre otros, así como en aislados no resistentes (Beverley *et al.*, 1984; White *et al.*, 1988; Hightower *et al.*, 1989; Ellenberger y Beverley, 1989; Ouellette *et al.*, 1990). Los otros ADNs circulares están menos estudiados, entre ellos se encuentran, el ADN G de 30-60 kb, descrito en *Leishmania* resistente a tunicamicina (Detke *et al.*, 1988; Katakura *et al.*, 1991), el ADN D de 75 kb descrito en *L. (L.) tropica* (Hightower *et al.*, 1988) y el ADN T descrito en *S. tarentolae* de 19 kb (Petrillo-Peixoto y Beverley, 1988, 1989).

Gajendran *et al.* (1989), Stuart *et al.* (1989) y Hamers *et al.* (1989) describen dos tipos de ácidos nucleicos específicos de *Leishmania* que presentan un comportamiento electroforético anormal cuando se someten a OFAGE. Estos elementos podrían poseer propiedades similares a los transposones y pueden estar parcialmente integrados en otros cromosomas. El ADN circular LD1 (llamado también CD1), de origen nuclear, presente en seis aislados de los complejos *L. donovani* y *L. infantum* (K42, 1-S, LRC-L51, VP74, LRC-61, Túnez y ITMAP 263), se encuentra integrado dentro del ADN lineal cromosómico (LD1) en otros aislados de *L. (L.) donovani* y en una cepa de *L. (V.) braziliensis*. El otro tipo de ácido nucleico es un ARN citoplasmático de una sola hebra (LR1) similar al ARN viral.

Se ha podido demostrar la presencia de LD1 lineal en el ADN cromosómico (200-550 kb) de aislados de diferentes especies de *Leishmania* del Nuevo y Viejo Mundo (Tripp *et al.*, 1991, 1992), así como la presencia de ambas formas de ADNs, LD1 circular y LD1 lineal, en diferentes clones derivados del mismo aislado de *L. (L.) mexicana* M379 (Liu *et al.*, 1989, 1990, 1991, 1992).

Beverley y Coburn (1990) describen cuatro nuevos ADNs lineales de tamaño pequeño (SLDs) en el aislado de *L. (L.) major* LT252, cuyas secuencias están relacionadas pero no son idénticas a las de CD1 y LD1 y están originadas en un cromosoma de 1,5 Mb. Estos autores agrupan estos cuatro nuevos ADNs lineales en la clase 715 de SLDs, no encontrando relación entre su aparición y resistencia a agentes selectivos, por lo que su aparición parece espontánea.

Navarro *et al.* (1992) describen minicromosomas relacionados con LD1/CD1 y la clase

715 de SLDs en clones de *L. (L.) major*, LV-561, con diferentes grados de virulencia en ratones Balb/c. Estos autores demuestran que estos minicromosomas no están relacionados con los diferentes grados de virulencia en el ratón.

1.2.4.- Kinetoplasto

El kinetoplasto es una estructura que se encuentra situada en todos los protozoos pertenecientes al orden kinetoplastida dentro de la membrana mitocondrial (Borst y Hoeijmakers, 1979; Barker, 1980), siendo uno de los ADNs más inusuales que se encuentran en la naturaleza (Simpson, 1972). Está constituido por un disco de 1-2 μm de diámetro, visible al microscopio óptico y que contiene 10^7 pares de bases de ADN mitocondrial (Chance y Walton, 1982; Lopes *et al.*, 1984). El ADNk representa del 10 al 20% de todo el ADN del parásito y está formado por una red gigante de miles de moléculas circulares, maxicírculos y minicírculos, concatenadas covalentemente (Simpson, 1979). El proceso de replicación de maxicírculos y minicírculos y el ensamblaje de la red de ADNk han sido objeto de numerosos estudios (ver revisiones de Ray, 1987; Ryan *et al.*, 1988; Pérez-Morga y Englund, 1993; Shlomai, 1994).

1.2.4.1.- Maxicírculos

El ADNk contiene unos 50 maxicírculos de 30 a 40 Kb. Los maxicírculos pueden ser separados mediante electroforesis del ADNk digerido con enzimas de restricción (Kleisen *et al.*, 1976; Weislogel *et al.*, 1977). En el caso de *Crithidia* y *Phytomonas* los maxicírculos representan aproximadamente un 5% del total del ADN (Kleisen *et al.*, 1976; Weislogel *et al.*, 1977), siendo mayor en el caso de *Trypanosoma brucei* (Fairlamb *et al.*, 1978). En *S. tarentolae* los maxicírculos presentan una densidad de 1'681 g/cm³ (79% A+T) y un peso molecular de $18-20 \times 10^6$ (Simpson, 1979). Los maxicírculos están formados por una región conservada y otra variable (Borst, 1991). Contienen secuencias de ADN a las que por homología se les atribuye el mismo papel que el ADN mitocondrial en otros sistemas celulares (Simpson y Simpson, 1978; Fairlamb *et al.*, 1978), como es contener los genes para los ARN ribosomales además de tener otras unidades transcripcionales (Hoeijmakers y Borst, 1982; Eperon *et al.*, 1983) y al menos 6 genes

estructurales (Benne *et al.*, 1983).

1.2.4.2.- Minicrículos

Los minicrículos son las moléculas más pequeñas de ADN mitocondrial que se pueden encontrar en la naturaleza (Barker, 1980), y su tamaño oscila entre 450 pb en *Trypanosoma congolense* y 2500 pb en las especies de *Crithidia*, pero dentro de cada red son idénticas en tamaño. Su función es desconocida aunque parece que están implicados en la estructura o replicación (o ambas) del ADNk (Kleisen *et al.*, 1976; Englund, 1978; Englund y Marini, 1980). También existe evidencia de la síntesis parcial de ARN a partir de ADNk de *Crithidia acantocephali* (Fouts y Wolstenholme, 1979).

El ADNk de *Leishmania* contiene de 10.000 a 20.000 minicrículos de 500 a 2.500 pb (10 a 20 familias) (Barker, 1987). Los minicrículos tienen alrededor de un 80% de su secuencia nucleotídica variable y el resto conservada (Riou y Yot, 1975, Frasch *et al.*, 1981). En la mayoría de las especies de *Leishmania* el 80% de los minicrículos tienen cuatro o menos clases de secuencias mayoritarias (Kidane *et al.*, 1984; Lawrie *et al.*, 1985; Lopes y Wirth, 1986; Barker *et al.*, 1986c; Rogers y Wirth, 1987, 1988). Este pequeño número de familias de secuencias supone que cada clase es representada por muchas copias (hasta 3000) de aproximadamente 600 pb que están disponibles para hibridar. Las secuencias conservadas tienen una homología de hasta un 90% entre las diferentes especies del mismo parásito (Macina *et al.*, 1986). Dentro de una misma especie todos los minicrículos tienen una secuencia conservada de aproximadamente 120 pb y una gran región variable. La organización de estas regiones en los minicrículos varía entre los diferentes tripanosomátidos. Sin embargo, hay dos secuencias conservadas cortas (presentes en todas las especies de tripanosomátidos) el dodecámero: 3'-ATGTGGTTGGGG-5', conocida como la secuencia universal de los minicrículos (UMS) y el hexámero 3'-ACGCCC-5' (Kitchen *et al.*, 1984; Ntambi *et al.*, 1985) de las que sólo se conocen dos excepciones, una en *Crithidia oncopelti* (Pestov *et al.*, 1990) y la otra en *S. tarentolae* (Kidane *et al.*, 1984).

Los minicrículos se comportan como unidades independientes mientras se produce la replicación. La variación entre las especies parece ser debida a mutaciones puntuales y a reorganizaciones, translocaciones e inserciones/delecciones, entre secuencias de

minicírculos preexistentes (Borst y Hoeijmakers, 1979; Hoeijmakers y Borst, 1982; Jasmer y Stuart, 1986a,b). Esta variabilidad contribuye a la evolución rápida del ADNk (Englund, 1979) que incluso ocasionaría diferencias en los patrones de esquizodemas del ADNk después de varios años de pases sucesivos de una cepa en el laboratorio (Hoeijmakers y Borst, 1982).

Existe una gran heterogeneidad en el ADNk de los tripanosomatidos lo que hace que los minicírculos se puedan agrupar en familias, permitiendo la caracterización de especies y aislados. *Crithidia* contiene de 10 a 20 familias (Steinert y Van Assel, 1980). En *Trypanosoma equiperdum* y *Trypanosoma evansi* sólo hay una familia, pero en *T. brucei* hay más de 300 (Borst y Hoeijmakers, 1979). *S. tarentolae* tiene tres familias (Challberg y Englund, 1980) y *L. (L.) major* unas veinte (Spithill y Grumont, 1984). En *Leishmania* lo más común son unas ocho o diez familias de minicírculos en las especies del Viejo Mundo y menos de cuatro para las del Nuevo Mundo.

La comparación de la secuencia de los minicírculos de *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* y *S. tarentolae* ha revelado una única región conservada entre los nucleótidos 1 y 170 en *L. (L.) major*. Esta región presenta dos regiones conservadas, que son compartidas por diferentes especies de *Leishmania*, *Sauroleishmania* y otros tripanosomátidos: la "secuencia universal" y el origen de replicación de los minicírculos (Smith *et al.*, 1989).

Los minicírculos no están sometidos a presiones genéticas, lo que es considerado por algunos autores como una gran ventaja para la caracterización de aislados mediante comparación de fragmentos de ADN. Sin embargo, para otros investigadores, el que la transcripción sea independiente de los minicírculos, es considerada como una desventaja por no ejercer influencia alguna ni en las propiedades morfológicas ni en las bioquímicas del parásito (Hoeijmaker y Borst, 1978; Fouts y Wolstenholme, 1979). Es decir, el parásito puede permanecer inalterable mientras que las secuencias de ADNk de los minicírculos pueden cambiar por mutación o por recombinación con otras cadenas de minicírculos ya existentes (Van Eys *et al.*, 1987).

En *Leishmania* los genes ribosomales están organizados en secuencias repetidas en tándem de las que existen unas 200 copias (León *et al.*, 1978; Villalba y Ramírez, 1982), y están localizados en bandas cromosómicas diploides (Galindo y Ramírez, 1989). Los genes ribosomales presentan secuencias conservadas y sólo 800 b, en la región central del gen muestra heterología (Dams *et al.*, 1988). Las secuencias conservadas están flanqueadas

por zonas intergénicas (espaciadoras) de diferente tamaño, debidas a un proceso de evolución más libre. Las regiones intergénicas (NTS) tienen un tamaño de unas 8,5 Kb (León *et al.*, 1978; Ramírez y Guevara, 1987).

El ARN se ha podido aislar del kinetoplasto de *S. tarentolae*, y está formado por dos fracciones de 9S y 12S. Estas fracciones hibridan con los maxicírculos de ADNK, por lo que en ellos está la información del ADN mitocondrial y no en los minicírculos (Simpson y Simpson, 1978; Simpson *et al.*, 1980).

1.3.- Reproducción del parásito: clonalidad o sexualidad

Durante los últimos diez años se ha ido imponiendo la idea de que durante el ciclo biológico de muchos protozoos parásitos puede tener lugar un intercambio genético. Las dos consecuencias genéticas fundamentales de la reproducción sexual son segregación (relación entre alelos en un mismo locus) y recombinación (relación entre alelos de diferentes loci); su ausencia en poblaciones naturales indicaría la inexistencia por tanto de este tipo de reproducción.

Recientemente muchos autores han podido demostrar en el laboratorio que algunos protozoos de importancia médica pueden sufrir recombinación genética: *T. brucei* (Jenni *et al.*, 1986; Jenni, 1990; Sternberg *et al.*, 1988; Walliker, 1989; Tait y Turner, 1990; Schweizer *et al.*, 1994)), *Plasmodium falciparum* (Walliker *et al.*, 1987; Walliker, 1989), *Plasmodium chabaudi* y *Plasmodium yoelii* (Walliker, 1983), *Eimeria* (Rollinson *et al.*, 1979), *Toxoplasma* (Pfefferkorn y Pfefferkorn, 1980), *Entamoeba histolytica* (Sargeant *et al.*, 1988; Blanc *et al.*, 1989) y *Leishmania* (Lanotte y Rioux, 1990). Sin embargo, otros autores han postulado que la recombinación genética tiene lugar también en poblaciones naturales de *T. brucei*, *T. gambiense* (Tait, 1980; Paindavoine *et al.*, 1989), *P. falciparum* (Walliker, 1983) y *Leishmania* (Evans *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1991), pero no en poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*, en el que la presencia de patrones heterocigóticos fijos soporta la hipótesis de que este protozoo es diploide, genéticamente polimórfico y tiene una estructura clonal que manifiesta una falta de sexualidad (Miles, 1983; Tibayrenc y Miles, 1983; Tibayrenc y Desjeux, 1983; Miles *et al.*, 1984; Tibayrenc *et al.*, 1984, 1986; Tibayrenc, 1985; Tibayrenc y Ayala, 1987; Brenière *et al.*, 1991; De Luca D'Oro *et al.*, 1993). La recombinación genética podría tener implicaciones médicas

y taxonómicas, como la transferencia de resistencia a fármacos, cambios en la patogenia e incluso podría cambiar el concepto de especie en *Leishmania* (Walliker, 1989).

El interés de la posible existencia de un sistema de intercambio genético entre los tripanosomas africanos se despertó en los inicios de la década de los años 80, como resultado de los estudios del análisis enzimático de diferentes aislados que revelaron diploidía y recombinación entre diferentes loci en este protozoo (Tait, 1980, Tait *et al.*, 1984; Tait *et al.*, 1985; Tait *et al.*, 1989).

Los primeros experimentos de intercambio genético llevados a cabo en el laboratorio con *T. brucei* fueron los de Jenni *et al.* (1986) y Sternberg *et al.* (1988, 1989) quienes demuestran que estos parásitos pueden completar su ciclo biológico con o sin intercambio genético, a partir de los experimentos de transmisión cíclica mixta de diferentes clones de *T. brucei* a través de moscas tsé-tsé. Las características de los híbridos fueron analizadas por Jenni *et al.* (1986), Paindavoine *et al.* (1986), Wells *et al.* (1987) y Le Page *et al.* Posteriormente, Gibson (1989, 1992) realiza el mismo experimento con clones de *T. rhodesiense* y *T. brucei* (1988). La existencia de intercambio genético implicaría meiosis y singamia, pero el orden de estos procesos está aún sin dilucidar (Jenni, 1990; Tait y Turner, 1990; Turner *et al.*, 1990). Recientemente, Schweizer *et al.*, (1994) han efectuado un experimento de intercambio genético, con dos clones de *T. brucei*, similar al descrito por Gibson (1989, 1992). Los clones obtenidos a partir de los híbridos mostraron un fenotipo característico de un híbrido. Así mismo, los estudios de cariotipo demostraron que estos híbridos no eran el resultado de una simple fusión ya que todos los clones fueron recombinantes para los cromosomas de tamaño intermedio.

Por otro lado, los estudios específicos de genética de poblaciones han demostrado la existencia de un sistema de reproducción básicamente clonal en poblaciones africanas de *T. brucei* (Truc y Tibayrenc, 1993), hipótesis que no es compartida con Cibulskis (1988, 1992).

En *P. falciparum*, haploide durante la mayor parte de su ciclo biológico, la formación del cigoto y la meiosis tienen lugar durante su desarrollo en el hospedador invertebrado. La recombinación genética se ha comprobado igualmente por transmisiones mixtas de clones a través del mosquito vector, lo que permite la fertilización cruzada de los gametos (Walliker, 1989).

No es hasta 1981 cuando se menciona la existencia de estructuras heterocigóticas en

el género *Leishmania*. Maazoun *et al.* (1981a) efectúan el análisis enzimático de 49 cepas de *Leishmania* mediante 8 sistemas enzimáticos, lo que revela la existencia de estructuras heterozigóticas entre ellas: *L. (L.) infantum* y *S. tarentolae* que son heterozigóticas para la GPI y *L. (L.) aethiopica* heterozigótica para GPI, PGM y 6PG. La presencia de más de un electromorfo es comparable a los patrones obtenidos con organismos con reproducción sexual, lo que permite sospechar la existencia de estructuras diploides y procesos de intercambio genético. Esta misma observación es confirmada por Le Blancq *et al.* (1983) en cepas de *L. (L.) major* con electromorfos para 6PG_{110/118}, 6PG₁₁₀ o 6PG₁₁₈, y posteriormente en *L. (L.) tropica* (Le Blancq *et al.*, 1986a).

Evans *et al.* (1987) aislan dos cepas de *Leishmania* en Arabia Saudí, una de un roedor del desierto (*Psammomys obesus*) y la otra de un perro doméstico (*Canis familiaris*) posibles híbridos naturales entre *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica*. Ambos aislados presentaron patrones isoenzimáticos diferentes de *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica*, especies que existen simpátricamente (Peters *et al.*, 1985, 1986) teniendo como vector a *Phlebotomus papatasi* (Killick-Kendrick *et al.*, 1985), lo que explicaría las amplias oportunidades de asociación de los dos parásitos y las posibilidades de intercambio genético entre ellas. El análisis enzimático junto con el estudio del ADN cromosómico por OFAGE y sondas de ADNk altamente específicas, puso de manifiesto que estos organismos podrían ser híbridos naturales de *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica*. Los minicírculos del ADNk del híbrido contenían secuencias específicas para *L. (L.) major* pero no para *L. (L.) arabica*. La utilización de sondas de ADNg permitió observar que las bandas correspondientes al ADN del híbrido estaban presentes siempre en el ADNg de *L. (L.) arabica* y *L. (L.) major*, lo que podría implicar diploidía y segregación alélica (Kelly *et al.*, 1991).

Pagès *et al.* (1989) estudian el cariotipo de 21 cepas y 14 clones de *L. (L.) infantum* mediante PFGE. Encuentran un elevado grado de polimorfismo dentro de esta especie en un área limitada, que no se puede relacionar con la variación isoenzimática. El polimorfismo afecta no sólo al tamaño, si no también al número de bandas cromosómicas, lo que podría sugerir tanto amplificación como delección en el ADN. Estos resultados sugieren la hipótesis de un inusual intercambio genético en estos organismos.

La distribución de formas variables de los cromosomas II y V y el análisis de frecuencias de asociación entre variantes en tamaño de ambos cromosomas, en 22 cepas de *L. (L.) infantum* relacionadas taxonómica y geográficamente, sugiere la existencia de

intercambio genético (Blaineau *et al.*, 1992b).

Otros argumentos indirectos que apoyan la existencia de intercambio genético en *Leishmania* son los hallazgos, no demasiado frecuentes, de estados multinucleados en división en *Lutzomyias* infectadas naturalmente con *L. (L.) mexicana* (Lainson y Shaw, 1986) y la descripción de un proceso de fusión celular "in vitro" entre *L. (L.) infantum* y *L. (L.) tropica* (Lanotte y Rioux, 1990). Recientemente Bañuls (1993) y Bañuls *et al.* (1994), describen la existencia de "híbridos naturales" en aislados de *Leishmania* del sur de Ecuador que podrían ser el resultado de una hibridación entre *L. (V.) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*.

Sin embargo, todos los intentos de cruzamiento experimental en el vector han fracasado. Gradoni *et al.* (1986), llevan a cabo un estudio experimental de infección mixta de *Phlebotomus perniciosus* con zimodemas simpátricos de *L. (L.) infantum* (MON-1 y MON-18), con el fin de estudiar la posible recombinación genética entre estos parásitos. De los 55 clones obtenidos, 24 pertenecieron al MON-1 y 31 al MON-18, y no observan ningún híbrido ni recombinación entre ambos zimodemas.

Posteriormente, Evans *et al.* (1989a) intentan en el laboratorio la producción de híbridos a partir de cultivos mixtos de clones de *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica* en medio de Tobie. La identificación de los productos de disección a partir de *Phlebotomus papatasi* alimentados tanto con amastigotes como promastigotes de ambas especies no mostraron la producción de híbridos.

Panton *et al.* (1991) comprueban que no tiene lugar un intercambio genético durante la multiplicación en *P. papatasi* infectados experimentalmente con dos clones de *L. (L.) major*. Estos resultados coinciden con los de Shehata *et al.* (1991) quienes realizan infecciones experimentales de *Phlebotomus langeroni* con los zimodemas MON-98 y MON-1 de *L. (L.) infantum*, así como con dos especies de *Leishmania*: *L. (L.) infantum* (MON-98) y *L. (L.) major* (MON-25) no encontrando en ningún caso evidencia de recombinación.

Los estudios sobre genética de poblaciones sugieren que los fenómenos de recombinación, si existen, son raros en poblaciones naturales de *Leishmania*.

Tibayrenc *et al.* (1990) y Tibayrenc y Ayala (1991) proponen una teoría general de reproducción clonal para los protozoos parásitos. Esta hipótesis de evolución clonal constituiría la base de las clasificaciones numéricas. Según este modelo, las variantes

genéticas individualizadas (zimodemas y esquizodemas) serían clones o familias de clones estrechamente emparentados, estables en el espacio y en el tiempo. En este sentido se considera que una especie es clonal cuando los descendientes son idénticos a los progenitores. La teoría clonal no implica la ausencia de recombinaciones genéticas en poblaciones naturales del parásito, sino que éstas no son lo suficientemente frecuentes para romper los patrones de prevalencia de la estructura de la población clonal (Tibayrenc, 1992). Esta teoría es, pues, perfectamente compatible con la obtención de recombinantes experimentales o con la observación de ciertos híbridos en la naturaleza y está muy relacionada con el concepto de clon desarrollado en bacteriología (Selander *et al.*, 1980).

Pagès *et al.*, (1992) por el contrario, apoyan la teoría de la existencia de poblaciones múltiples que coexisten en un área geográfica restringida, "foco", donde existen escasas oportunidades para la anfimixia (reproducción sexual entre descendientes de dos líneas diferentes, es decir, individuos no relacionados entre sí) y una tendencia intrínseca para la automixia (reproducción sexual dentro de la misma línea de descendientes, es decir, dentro de un clon o entre clones estrechamente relacionados) (Bastien *et al.*, 1992a).

1.4.- Métodos de caracterización del parásito

La necesidad de diferenciar y caracterizar poblaciones de parásitos para un mejor diagnóstico, tratamiento y control y la influencia que la variación intraespecífica puede tener en la epidemiología de la enfermedad parasitaria, ha dado lugar al desarrollo de numerosos métodos tanto extrínsecos como intrínsecos para la diferenciación y caracterización de los mismos (ver revisión de Thompson, 1988).

Entre los métodos intrínsecos, hay que destacar la caracterización enzimática, la técnica más ampliamente utilizada en la caracterización de *Leishmania* y que se ha aplicado a un gran número de protozoos parásitos (ver Tabla 1).

Otros métodos de caracterización de *Leishmania* son la comparación de los patrones del ADN digerido con enzimas de restricción o "esquizodemas", hibridación con sondas de ADN, anticuerpos monoclonales y PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (ver revisiones de Gárate y Alvar, 1993 y Gradoni, 1993).

Tabla 1.- Caracterización de protozoos parásitos mediante isoenzimas.

PROTOZOO	REFERENCIA
SUBPHYLUM SARCODINA	
- Amebas de vida libre	
Género <i>Naegleria</i>	
<i>N. fowleri</i>	Nerad y Dagget (1979) Dagget y Nerad (1983) Kilvington <i>et al.</i> (1983) Pernin <i>et al.</i> (1984, 1985) Moss <i>et al.</i> (1988) Lares-Villa <i>et al.</i> (1993)
Género <i>Acanthamoeba</i>	
<i>A. culbertsoni</i>	De Jonckheere (1983) Matías <i>et al.</i> (1991)
- Amebas del aparato digestivo	
Género <i>Entamoeba</i>	
<i>E. histolytica</i>	Sargeaunt <i>et al.</i> (1978, 1982, 1982a,b,c, 1984, 1988); Sargeaunt y Williams (1978, 1979, 1980a,b); Farri <i>et al.</i> (1980); Sargeaunt (1985, 1987a,b); Mirelman y Bracha (1984); Mirelman <i>et al.</i> (1986a,b); Mirelman (1987); Chadee <i>et al.</i> (1985); Smith y Meerovitch <i>et al.</i> (1985); Proctor <i>et al.</i> (1987); Moss y Mathews (1987); Blanc <i>et al.</i> (1989); Vohra <i>et al.</i> (1989); Blanc y Sargeaunt (1991); Andrews <i>et al.</i> (1990); Nozaki <i>et al.</i> (1989, 1990); Scaglia <i>et al.</i> (1991); Clark <i>et al.</i> (1992); Vrochotová <i>et al.</i> (1993); Mukherjee <i>et al.</i> (1993); Vargas y Orozco (1993).
ORDEN KINETOPLASTIDA	
Género <i>Trypanosoma</i>	
<i>T. cruzi</i>	Ready y Miles (1979); Kreutzer y Sousa (1980); Miles <i>et al.</i> (1980, 1983, 1984); Lanham <i>et al.</i> (1981); Goldberg y Pereira (1983); Miles y Cibulskis (1986); Andrade <i>et al.</i> (1983); Tibayrenc (1985); Tibayrenc y Miles (1983); Tibayrenc y Desjeux (1983); Tibayrenc <i>et al.</i> (1984, 1986, 1990); Montamat <i>et al.</i> (1987, 1992); Tibayrenc y Ayala (1987); Bogliolo y Godfrey (1987); Romanha y Brener (1988); Van Bueren <i>et al.</i> (1989); Brenière <i>et al.</i> (1989, 1991); Barr <i>et al.</i> (1990); Carneiro <i>et al.</i> (1991); Solari <i>et al.</i> (1992); De Luca d'Oro <i>et al.</i> (1993); Heriksson <i>et al.</i> (1993); McDaniel y Ovorak (1993); Alves <i>et al.</i> (1993); Teixeira <i>et al.</i> (1993).
Trypanosomas africanos	Godfrey y Kilgour (1976); Tait (1980); Tait <i>et al.</i> (1984, 1985, 1989); Gibson y Gashumba (1983); Godfrey (1984); Boid (1985, 1988); Jenni <i>et al.</i> (1986); Paindavoune <i>et al.</i> (1986, 1989); Godfrey <i>et al.</i> (1987); Stemberg <i>et al.</i> (1988); Gashumba <i>et al.</i> (1988); Knowles <i>et al.</i> (1988); Richner <i>et al.</i> (1989); Tait y Turner (1990); Truc y Tibayrenc (1993); Mathieu-Daudé y Tibayrenc (1994)

Tabla 1.- Caracterización de protozoos parásitos mediante isoenzimas (continuación).

PROTOZOO	REFERENCIA
PHYLUM APICOMPLEXA	
Género <i>Sarcocystis</i>	O'Donoghue <i>et al.</i> (1986)
Género <i>Babesia</i>	Moss <i>et al.</i> (1986)
Género <i>Besnoitia</i>	Le Blancq <i>et al.</i> (1986c)
Género <i>Eimeria</i>	Long y Joyner (1984) Nakamura <i>et al.</i> (1988) Andrews <i>et al.</i> (1990)
Género <i>Theileria</i>	Allsopp <i>et al.</i> (1985)
Género <i>Toxoplasma</i>	Dardé <i>et al.</i> (1987, 1988a, 1988b, 1990, 1992)
Género <i>Plasmodium</i>	
<i>Plasmodium falciparum</i>	Carter y Voller (1973, 1975) Thaithong <i>et al.</i> (1981); Hempelmann <i>et al.</i> (1981); Sanderson y Walliker (1981); Myint-Oo <i>et al.</i> (1984); Graves <i>et al.</i> (1984); Webster <i>et al.</i> (1985); Freese y Markus (1990); Creasey <i>et al.</i> (1990).
<i>Plasmodium vivax</i>	Joshi <i>et al.</i> (1989)
Plasmodios de roedores	Carter y Walliker (1977); Carter (1978)
ORDEN DIPLOMONADIDA	
Género <i>Giardia</i>	Bertram <i>et al.</i> (1983); Meloni y Thompson (1987); Meloni <i>et al.</i> (1988, 1989, 1991); Isaac-Rentom <i>et al.</i> (1988, 1993); Proctor <i>et al.</i> (1989); Cedillo-Rivera <i>et al.</i> (1989); Straden <i>et al.</i> (1990); Horak <i>et al.</i> (1990); Abaza <i>et al.</i> (1991); Andrews <i>et al.</i> (1992a, 1992b); Homan <i>et al.</i> (1992); Mayrhofer <i>et al.</i> (1992); Campbell y Faubert (1994); Morgan <i>et al.</i> (1993).
ORDEN TRICHOMONADIDA	
Género <i>Trichomonas</i>	Takayanagi <i>et al.</i> (1971), Soliman <i>et al.</i> (1982); Gradus y Mathews (1985).

1.4.1.- Caracterización mediante isoenzimas

El desarrollo de la electroforesis en geles de almidón (Smithies, 1955) y la aplicación de los métodos de coloración histoquímica a la misma (Hunter y Marker, 1957) permitió el descubrimiento de los "isoenzimas" (Marker y Moller, 1959), enzimas con la misma función pero que presentan diferente movilidad cuando se someten a un campo eléctrico. Las poblaciones de parásitos de una misma especie que poseen los mismos perfiles enzimáticos se han denominado "zimodemas" (Lumsden, 1977).

Los principios de la electroforesis y su metodología han sido objeto de numerosas publicaciones, entre ellas se recomiendan las de Harris y Hopkinson (1976), Rider y Taylor (1980), Bullini (1984) y Murphy *et al.* (1990).

Desde su descubrimiento, el análisis enzimático ha revolucionado el concepto de variación intraespecífica en Parasitología, aplicándose a un gran número de parásitos para estudios taxonómicos y epidemiológicos. En *Leishmania* esta técnica resulta indispensable siendo por tanto una herramienta de gran utilidad taxonómica que ha contribuido en gran medida a comprender mejor la epidemiología de la leishmaniosis cutánea y visceral (Chance *et al.*, 1977, 1985).

La caracterización enzimática se lleva a cabo en diferentes soportes como son el acetato de celulosa (Kreutzer y Christensen, 1980; Kreutzer *et al.*, 1983; Andrews *et al.*, 1988), poliacrilamida (Gardener *et al.*, 1974; Piarroux *et al.*, 1994) y almidón, siendo este último el más utilizado y el que ofrece mejores resultados (Miles *et al.*, 1979; Maazoun *et al.*, 1981a,b). Estos métodos, referidos a *Leishmania*, han sido ampliamente revisados por Momen (1984) y Evans *et al.* (1989b).

Así, se ha podido establecer una enorme diversidad genética en el seno de numerosos complejos de *Leishmania* (Lanotte *et al.*, 1981, 1986; Le Blancq *et al.*, 1983, 1987; Le Blancq y Peters, 1986b; Schnur *et al.*, 1981; Schnur y Le Blancq, 1986; Shurkhal *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 1986a,b; Kreutzer *et al.*, 1987; Al-Hussayni *et al.*, 1987; Rioux *et al.*, 1990a).

En el Viejo Mundo la caracterización enzimática ha desempeñado un papel de gran importancia, permitiendo la separación de *L. (L.) major* y *L. (L.) tropica* (Al-Taqi y Evans, 1978; Rassam *et al.*, 1979; Aljeboori y Evans, 1980a,b).

Le Blancq *et al.* (1983) estudian aislados de *L. (L.) major* de humanos, *Psammomys obesus*, *Meriones crassus* y *P. papatasi* obtenidos en diferentes áreas de Israel. Estos

autores encuentran tres variantes enzimáticas con el enzima 6PG asociadas a diferentes áreas geográficas. En un trabajo posterior, Le Blancq y Peters (1986a) estudian la distribución de zimodemas de *L. (L.) major* de un total de 135 aislados, mediante trece sistemas enzimáticos, encontrando polimorfismo enzimático en cuatro de ellos.

Maazoun *et al.* (1986) establecen 10 zimodemas de *L. (L.) major* gracias al análisis con 15 sistemas enzimáticos. En Africa y en el norte y sur del Sahara se han descrito tres zimodemas de *L. (L.) major* (MON-25, MON-26 y MON-117), distribuidos en áreas geográficas diferentes. MON-25 principalmente en las regiones presaharianas del Magreb (Garin *et al.*, 1985), en países como Argelia (Belazzoug, 1984, 1986a,b; Belazzoug *et al.*, 1986; Izri *et al.*, 1992), Túnez (Rioux *et al.*, 1983) y Marruecos (Rioux *et al.*, 1986c), donde parece que *P. papatasi* está implicado en la transmisión. MON-26 ocupa un área más extensa, como la península Arábiga, próximo y medio Oriente, el Africa sahariana (Maazoun *et al.*, 1986; Rioux *et al.*, 1986c) y Senegal (Dedet *et al.*, 1986). Este mismo zimodema se ha descrito también en Malí (Izri *et al.*, 1989). Rioux *et al.* (1990b, 1992) identifican *L. (L.) major* MON-26 en *Psammomys obesus* en un estudio ecoepidemiológico llevado a cabo en Siria. Un nuevo zimodema, MON-117, ha sido descrito recientemente en Mauritania (Belazzoug *et al.*, 1992).

Wahba *et al.* (1990) aislan y caracterizan *L. (L.) major* de *P. papatasi* en el norte de Sinaí, Egipto. Mansour *et al.* (1991) aislan y caracterizan esta especie de *P. papatasi* y de personal militar en esta misma área.

Desde los trabajos iniciales de Lanotte *et al.* (1981), muchos otros han confirmado la diversidad enzimática del complejo de *L. (L.) tropica*. En 1986 se establecieron 17 zimodemas (Pratlong *et al.*, 1986), si bien Le Blancq *et al.* (1986a) describen 18. En 1990 un trabajo complementario eleva el número de zimodemas a 28 (Rioux *et al.*, 1990a). Gramiccia *et al.* (1984) realizan por primera vez la caracterización enzimática de cuatro aislados cutáneos de Turquía que resultaron ser *L. (L.) tropica*.

El análisis eco-epidemiológico de un foco marroquí de leishmaniosis cutánea, debida a *L. (L.) tropica*, ha dejado patente un elevado polimorfismo (7 zimodemas han sido identificados de un total de 149 aislados del hombre, de perro y del vector *Phlebotomus sergenti*), así como la dispersión occidental de esta especie y la participación del perro como reservorio (Pratlong *et al.*, 1991; Guilvard *et al.*, 1991).

La especie *L. (L.) aethiopica* ha sido estudiada mediante isoenzimas por Peters *et al.*,

1977) y Chance *et al.*, (1978). Le Blancq *et al.* (1986b) estudian los perfiles enzimáticos de 28 aislados de *L. (L.) aethiopica*, describiendo 13 zimodemas dentro de esta especie.

L. (L.) arabica ha podido ser separada de *L. (L.) major* gracias a la diferencia en sus perfiles enzimáticos (Peters *et al.*, 1985, 1986).

El análisis enzimático ha permitido la descripción de nuevas especies como *L. (L.) killicki*, en el curso de una epidemia de leishmaniosis cutánea en Túnez (Rioux *et al.*, 1986d) y *L. (L.) turanica* aislada de un roedor *Rhombomys opimus* en Rusia y Mongolia, donde existe simpátricamente junto con *L. (L.) major* y *L. (L.) gerbili* (Strelkova *et al.*, 1990).

La afinidad de la especie de *L. (L.) chagasi* causante de LV en América con *L. (L.) infantum* ha sido estudiada mediante análisis enzimático. Moreno *et al.* (1986b) caracterizan 10 aislados de LV en América mediante 15 sistemas enzimáticos no encontrando diferencias con *L. (L.) infantum*. Estos estudios son apoyados por Killick-Kendrick *et al.* (1985) quienes sugieren que *L. (L.) infantum* fue introducida en América por los perros de los conquistadores. Por el contrario, Lainson *et al.* (1987) opinan que ambas especies son diferentes.

Schnur *et al.*, (1981) estudian el complejo de *L. donovani* mediante 4 sistemas enzimáticos lo que no les permite establecer heterogeneidad dentro del mismo. Cuando otros autores realizan el mismo estudio con un mayor número de sistemas enzimáticos encuentran que ciertas cepas presentan diferente movilidad para el enzima GOT (Aljeboori y Evans, 1980a; Lanotte *et al.*, 1981). Le Blancq y Peters (1986b) estudian el complejo de *L. donovani sensu lato* mediante 13 sistemas enzimáticos y establecen tres grupos en función de los resultados del análisis enzimático: a) *L. (L.) donovani sensu stricto* de India, Kenya, Etiopía y Sudán, b) *L. (L.) infantum* de Túnez, Italia y Portugal y c) cepas de Arabia Saudí, norte de Etiopía e Iraq. Moreno *et al.* (1986b) individualizan el complejo de *L. infantum* del complejo de *L. donovani s.l.* mediante análisis enzimático. *L. donovani* estaría circunscrita a Asia y este de África y *L. infantum* se extendería por China, cuenca Mediterránea y norte de África.

En el Nuevo Mundo la caracterización enzimática ha permitido estudiar el papel de los reservorios, vectores y de las especies del parásito responsables de las leishmaniosis cutáneas y mucocutáneas. Así se ha hecho en Brasil (Miles *et al.*, 1979; Lainson *et al.*, 1979, 1981, 1982, 1983; Arias *et al.*, 1985; Cuba Cuba *et al.*, 1984, 1985; Momen *et al.*,

1985; Braga *et al.*, 1986; Vasconcelos *et al.*, 1988), Belize (Evans *et al.*, 1984; Lainson, 1984), Guatemala (Porter *et al.*, 1987), Guayana Francesa (Dedet *et al.*, 1985; Desjeux y Dedet, 1989; Dedet, 1990), Ecuador (Mimori *et al.*, 1989; Armijos *et al.*, 1990), Colombia (Saravia *et al.*, 1985; Weigle *et al.*, 1986; Corredor *et al.*, 1990), Panamá (de Vasquez *et al.*, 1990), Perú (Ebert, 1987; Romero *et al.*, 1987; Revollo *et al.*, 1992), Bolivia (Urgel *et al.*, 1986, 1989; Desjeux *et al.*, 1986a,b, 1987; Revollo *et al.*, 1992) y Nicaragua (Missoni *et al.*, 1986).

Por citar algunos ejemplos más concretos, el análisis enzimático ha permitido diferenciar entre *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) peruviana* (Arana *et al.*, 1990). Franke *et al.* (1990) describen un caso de leishmaniosis cutánea difusa adquirida en Perú; el análisis enzimático reveló que el agente causal era *L. (L.) amazonensis*.

Moreno *et al.*, (1986a) individualizan el complejo de *L. guyanensis*, separándolo del complejo de *L. braziliensis* mediante trece sistemas enzimáticos.

Por otro lado, la caracterización enzimática ha puesto en evidencia por primera vez, LC humana en Brasil debida a *L. (V.) naiffi* (Lainson *et al.*, 1990), especie que hasta el momento sólo había sido aislada del armadillo (*Dasypus novemcinctus*) (Lainson y Shaw, 1989), otro caso de LC debida a *L. (V.) lainsoni* (Silveira *et al.*, 1987) y un último caso debido a *L. (V.) shawi* (Lainson *et al.*, 1989), parásito de monos en la región del Amazonas (Shaw *et al.*, 1991).

En Colombia se ha identificado mediante isoenzimas a *L. (V.) guyanensis*, como responsable de tres casos de leishmaniosis cutánea mucosa (Santrich *et al.*, 1990). El análisis enzimático ha permitido documentar el primer caso de LV debida a *L. (L.) amazonensis* en Brasil (Barral *et al.*, 1986).

El estudio de los datos obtenidos a partir del análisis enzimático de aislados de *Leishmania* de Perú y Ecuador desde el punto de vista de genética de poblaciones y filogenia han permitido esclarecer algunos problemas sobre la epidemiología de la leishmaniosis en Perú y en Ecuador (Guerrini, 1993).

Dedet *et al.* (1994) describen un nuevo caso de leishmaniosis cutánea en Guayana Francesa, el análisis enzimático puso en evidencia la presencia de *L. (V.) braziliensis*.

El análisis enzimático junto con otros criterios bioquímicos y biológicos ha permitido la descripción de nuevas especies de *Leishmania* como: *L. (L.) venezuelensis* en Venezuela (Bonfante-Garrido, 1980), *L. (V.) colombiensis* sp. en Colombia y Panamá (Kreutzer *et*

al., 1991) y *L. (V.) equatorensis* sp. en Ecuador (Grimaldi *et al.*, 1992) .

1.4.2.- Caracterización mediante sondas de ADN

1.4.2.1.- Sondas de ADNk

Las características que reúne el ADNk, (de las que ya se habló en el apartado 1.2.5.), ha permitido su amplia utilización en la identificación y diagnóstico de *Leishmania*. En muchas especies de *Leishmania*, el 80% de la secuencia del ADNk está constituida por cuatro o menos familias de minicírculos. Esto significa que cada familia de minicírculo está representada por más de 1000 copias, con unos 600 pb disponibles para hibridar ("secuencias diana"), lo que constituye una herramienta de gran utilidad para el diagnóstico. El resto de la secuencia es variable (20% de divergencia) y tiene gran interés en estudios tanto taxonómicos como filogenéticos.

El análisis de los patrones de ADNk obtenidos por digestión con endonucleasas o esquizodemas, término inicialmente empleado para el estudio de las poblaciones de *Trypanosoma cruzi* (Morel y Simpson, 1980; Morel *et al.*, 1980; Morel *et al.*, 1986), aunque son de gran complejidad, ha sido utilizado en la caracterización de *Leishmania* (Jackson *et al.*, 1984; Lopes *et al.*, 1984; Pacheco *et al.*, 1986) y ha permitido establecer variabilidad entre 29 cepas de *L. (L.) infantum* (Angelici *et al.*, 1989).

Si bien algunos autores han trabajado con ADNk total, la utilización de fragmentos de ADNk clonados ha permitido desarrollar sondas de mayor sensibilidad y especificidad para el diagnóstico (ver revisiones de Barker *et al.*, 1982; Wirth *et al.*, 1986; Barker *et al.*, 1986b; Barker, 1987, 1989a,b; Barker, Jr., 1990; Blackwell, 1992).

La utilización de sondas de ADNk total ha facilitado la discriminación de los complejos de *L. mexicana* y *L. braziliensis*, ya que los minicírculos de ADNK no comparten ninguna homología en su secuencia (Wirth y McMahon-Pratt, 1982; Barker y Butcher, 1983; Wirth *et al.*, 1986), y ha permitido reclasificar *L. (V.) peruviana*, como miembro del complejo de *L. braziliensis*, a pesar de presentar un fenotipo clínico típico de *L. (L.) mexicana* (Romero *et al.*, 1987; López *et al.*, 1988, 1989).

Jackson *et al.* (1984) no encuentran homología entre el ADNk de *L. (L.) donovani*, *L. (L.) aethiopica* y *L. (V.) panamensis*, pero sí entre *L. (L.) donovani*, *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major* cuando utilizan una sonda de ADNk de *L. (L.) donovani*. Estos mismos

autores diferencian *L. (L.) mexicana* de *L. (V) panamensis*, especies que comparten la misma área geográfica, mediante hibridación con sondas de ADNk. Así mismo, encuentran escasa homología entre *L. (L.) mexicana*, *L. (L.) major* y *L. (L.) donovani* (Jackson *et al.*, 1986).

La hibridación con sondas de ADNk y la caracterización mediante isoenzimas ha permitido discriminar entre *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major* (Spithill y Grumont, 1984).

La homología en la secuencia de ADNk ocurre entre diferentes especies del Viejo Mundo. Así, el ADNk de *Leishmania major* hibrida con el ADNk de *Leishmania tropica*, *Leishmania aethiopica* y *Leishmania donovani* (Lawrie *et al.*, 1985; Kennedy, 1984). La secuencia de ADNk de *L. (L.) aethiopica* se encuentra más estrechamente relacionada con *L. (L.) tropica* y *L. (L.) major* que con *L. (L.) donovani* y *L. (L.) infantum* (Laskay *et al.*, 1991a).

Las secuencias de fragmentos de ADNk clonadas de *L. (L.) donovani* o *L. (L.) infantum* han demostrado especificidad al compararlas con ADNk de otras especies y se han utilizado para el diagnóstico de especies del Viejo Mundo tanto productoras de leishmaniasis cutáneas como viscerales (Lopes y Wirth, 1986; Alvar *et al.*, 1989b; Smith *et al.*, 1989; Gramiccia *et al.*, 1992a).

Las sondas de ADNk total y recombinante han sido utilizadas con éxito para identificar parásitos de cultivo mediante hibridaciones en forma de mancha ("dot-blot") (Laskay *et al.*, 1991a; Gramiccia *et al.*, 1992b), en material de biopsias empleando hibridaciones por contacto ("touch preparations") (Wirth y Mc Mahon-Pratt, 1982; Jackson *et al.*, 1984; Wirth *et al.*, 1986; López *et al.*, 1989; Ben-Ismael *et al.*, 1992), así como en mosquitos infectados experimentalmente en hibridaciones por aplastamiento ("squash preparations") (Ready *et al.*, 1988; Rogers *et al.*, 1988; Laskay *et al.*, 1991b).

En la Tabla 2 se muestra una recopilación de las sondas de ADNk utilizadas en la caracterización y diagnóstico de *Leishmania* así como la metodología seguida por cada uno de los autores en cada caso.

TABLA 2.- Sondas de ADNk de *Leishmania*.

Especie	Sonda	Parásitos ^a /Muestra ^b	Método ^c	Referencia
<u>L. (L.) tropica</u> <u>L. (L.) aethiopica</u>		ADNk digerido con Eco RI, BamHI, HpaII, MboI	A	Amot y Barker (1981)
<u>L. (L.) tropica</u> <u>L. (L.) mexicana</u> <u>L. (V.) braziliensis</u>	ADNk purificado	< 10 ⁴ promastigotes	B A C	Wirth y Mc Mahon-Pratt (1982)
<u>L. (V.) braziliensis</u> <u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk total	ADNk digerido Hae III	A	Barker y Butcher (1983)
<u>L. (L.) major</u> <u>L. (L.) tropica</u> <u>L. (L.) donovani</u> <u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk total	10 ⁴ -10 ⁶ promastigotes	B A	Spithill y Grumont (1984)
<u>L. (L.) tropica</u> <u>L. (L.) major</u> <u>L. (L.) aethiopica</u>	ADNk recombinante ADNk total	- ADNk digerido HaeIII, MboI, BamHI, TaqYI	D A	Kennedy (1984)
<u>L. (L.) donovani</u>	ADNk total	ADNk digerido HpaII	A	Jackson <i>et al.</i> (1984)
<u>L. (L.) infantum</u> <u>L. (L.) donovani</u>	ADNk recombinante	5x 10 ³ promastigotes ADNk digerido MspI	B A	Lawrie <i>et al.</i> (1985)
<u>L. (V.) braziliensis</u> <u>L. (V.) guyanensis</u>	Minicúculos de ADNk	10 ⁴ promastigotes < 100 promastigotes* ADNk digerido Hae III	B B A D	Barker <i>et al.</i> (1986b,c)
<u>L. (L.) donovani</u>	ADNk recombinante	- 10 ⁵ -10 ⁶ promastigotes	C B	Jackson <i>et al.</i> (1986)
<u>L. (L.) donovani</u> <u>L. (L.) chagasi</u>	ADNk recombinante ADNk total	10 ⁵ promastigotes ADNk digerido Alu I	B A	Lopes y Wirth (1986)
<u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk recombinante	-	C	Wirth <i>et al.</i> (1986)
<u>L. (L.) donovani</u>	ADNk recombinante	400 promastigotes	B	Ellis y Crampton (1986)
<u>L. (V.) braziliensis</u> <u>L. (V.) guyanensis</u> <u>L. (L.) amazonensis</u> <u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk total	10 ⁹ promastigotes	B	Romero <i>et al.</i> (1987)
	ADNk recombinante ADNk total	ADNk digerido Hae III Alu I	A	Rogers y Wirth (1987)
<u>L. (L.) braziliensis</u> <u>L. (V.) guyanensis</u> <u>L. (L.) amazonensis</u> <u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk recombinante	10 ² -10 ³ -10 ⁴ promastigotes < 100 promastigotes*	B	López <i>et al.</i> (1988)

a: número de parásitos para las hibridaciones en forma de mancha ("dot-blot")

b: preparación del ADN para la hibridación

c: método de preparar la muestra para la hibridación

* mínimo número de parásitos detectados en Dot-blot

A: Transferencia mediante capilaridad según Southern (Southern, 1975)

B: Hibridación en forma de mancha ("Dot-blot") C: Hibridación por contacto ("Touch-blot")

D: Hibridación "in situ" E: Hibridación por aplastamiento ("Squash-blot")

TABLA 2.- Sondas de ADNk de *Leishmania* (continuación).

Especie	Sonda	Parásitos ^a /Muestra ^b	Método ^c	Referencia
<u>L. (V.) guyanensis</u>	ADNk total	-	E	Rogers <u>et al.</u> (1988)
<u>L. (L.) major</u>	ADNk total	-	E	Ready <u>et al.</u> (1988)
<u>L. (L.) braziliensis</u> <u>L. (V.) guyanensis</u> <u>L. (L.) amazonensis</u> <u>L. (L.) mexicana</u>	ADNk recombinante	10 ² -10 ³ -10 ⁴ < 100 promastigotes*	B,C	López <u>et al.</u> (1989)
<u>L. (L.) major</u> <u>L. (L.) tropica</u> <u>L. (L.) arabica</u>	ADNk total ADNk recombinante	10 ⁴ -10 ⁷	A,B	Chapman <u>et al.</u> (1989)
<u>L. (L.) major</u>	ADNk recombinante	ADNk digerido EcoRI, Taq I 10 ⁴ -10 ⁵ -10 ⁶ promast.	A B	Smith <u>et al.</u> (1989)
<u>Leishmania</u> spp.	ADNk recombinante	0.5µg-1µg-5µg de ADNk	A	Das Gupta <u>et al.</u> (1991)
<u>Leishmania</u> spp.	ADN recombinante	-	D	Schoone <u>et al.</u> (1991)
<u>L. (L.) aethiopica</u>	ADNk recombinante ADNk total	10 ⁵ promastigotes	B	Laskay <u>et al.</u> (1991a)
<u>L. (L.) aethiopica</u>	ADNk recombinante	1000 ó más parásitos	E	Laskay <u>et al.</u> (1991b)
<u>L. (L.) infantum</u> MON-24	ADNk recombinante	Biopsias	C	Ben-Ismaïl <u>et al.</u> (1992)
<u>L. (L.) infantum</u> MON-24	ADNk recombinante	10 ⁴ -10 ⁵ promastigotes	B	Gramiccia <u>et al.</u> (1992a)
<u>L. (L.) infantum</u> MON-29	ADNk recombinante	10 ⁴ promastigotes	B	Alvar <u>et al.</u> (1989b)

a: número de parásitos para las hibridaciones en forma de mancha ("dot-blot")

b: preparación del ADN para la hibridación

c: método de preparar la muestra para la hibridación

* mínimo número de parásitos en "dot-blot"

A: Transferencia mediante capilaridad según Southern (Southern, 1975)

B: Hibridación en forma de mancha ("Dot-blot") C: Hibridación por contacto ("Touch-blot")

D: Hibridación "in situ"

E: Hibridación por aplastamiento ("Squash-blot")

1.4.2.2.- Sondas de ADNg

No existen muchos trabajos acerca de la aplicación de sondas de ADNg en la caracterización de aislados de *Leishmania*.

Los clones seleccionados a partir de librerías de ADNg y ADNc han sido utilizados como sondas con fines diagnósticos y taxonómicos (Van Eys *et al.*, 1989, 1991; Howard *et al.*, 1991, 1992). Estos clones podrían ser parte de genes "housekeeping" y estar presentes en todas las especies de *Leishmania*. Los exones de estos genes están bastante conservados, mientras que los intrones presentan cierto grado de variación cualidad que es utilizada para la caracterización y diagnóstico de *Leishmania*.

Van Eys *et al.* (1989) obtienen un clon, denominado 7-059, a partir de una librería de ADNc de *L. (L.) infantum*, ITMAP263, que permite diferenciar *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major*, *L. (L.) aethiopica* y *L. (L.) donovani*/ *L. (L.) infantum*. La aplicación del análisis enzimático y la hibridación con la sonda 7-059, ha permitido identificar *L. (L.) infantum* como responsable de un caso de leishmaniosis mucocutánea en España (Alvar *et al.*, 1990) y *L. (L.) major* causante de leishmaniosis cutánea difusa (LCD) en Sudán (Abdel-Hameed *et al.*, 1990)

La sonda de ADN recombinante capaz de discriminar entre *L. (L.) donovani* y *L. (L.) infantum*, denominada pDK20, se obtuvo a partir de una librería de ADNg de *L. (L.) major* (MHOM/SN/00/DK1) (Van Eys *et al.*, 1991). Esta sonda ha identificado *L. donovani* s.l. y *L. (L.) major* como causantes de leishmaniosis mucocutánea en Sudan (Ghalib *et al.*, 1992).

Otro clon, pdK10, obtenido a partir de la misma librería se ha utilizado como herramienta para incluir el zimodema LON-58/MON-21 en una nueva especie, *L. (L.) turanica* (Strelkova *et al.* 1990). Así mismo, ha sido de gran valor en la descripción de un híbrido entre *L. (L.) major* y *L. (L.) arabica* (Kelly *et al.* 1991). Más recientemente, este clon ha permitido diferenciar complejos fenéticos cuando se ensayó frente a un panel de 58 cepas de *Leishmania*, procedentes de 14 países del Viejo Mundo y pertenecientes a 45 zimodemas (Guizani *et al.*, 1994)

Howard *et al.* (1990, 1991) construyen una librería de ADNc de *L. (L.) donovani* (MHOM/ET/67/HU3) en el bacteriófago λ gt11 y seleccionan un clon, Lmet 2, específico para *L. donovani* s.l. constituido por cuatro copias de una secuencia repetida en tándem de 60 pb, presente en al menos seis cromosomas. Esta sonda reconoce menos de 100

promastigotes en hibridaciones en forma de mancha ("Dot/Slot-blot"), detecta promastigotes de *Lutzomyia longipalpis* infectadas experimentalmente mediante hibridaciones por aplastamiento ("Squash-blot"), así como amastigotes en biopsias de cricetos infectados experimentalmente en hibridaciones por contacto ("Touch-blots"). La secuencia complementaria de Lmet 2 ha sido utilizada para construir unos iniciadores útiles en la amplificación del ADN mediante PCR. La sensibilidad y eficacia de la sonda ha sido confirmada recientemente en el diagnóstico de seis casos de leishmaniosis visceral (Howard *et al.*, 1992).

Wilson *et al.* (1992) determinan la sensibilidad del clon Lmet2 marcado con digoxigenina frente al complejo de *L. donovani*. La sensibilidad fue más elevada que la obtenida previamente por Howard *et al.* (1991) con el mismo clon marcado con P³² lo que supone una gran ventaja y menor riesgo en el diagnóstico rutinario.

1.4.2.3.- Sondas ribosomales

La organización de los cistrones en los ribosomas muestra ciertas características que hacen de estos un instrumento de gran utilidad para la búsqueda de secuencias específicas y el desarrollo de un método sensible para la detección de *Leishmania*.

El ADNg contiene unas 160 copias del gen SSU ARNr ó 18S ARNr (subunidad pequeña de ARNr) y el citoplasma más de 10⁴ moléculas de SSU ARNr (Leon *et al.*, 1978). La presencia de dos bloques de secuencias, en la parte central del gen, específicas para Kinetoplastida, ofrece la oportunidad de diseñar sondas de alta sensibilidad y buena especificidad. Las homologías en estos dos bloques de secuencias son del 54% entre *Leishmania* y tripanosomas, y del 89% entre *Leishmania* y *Crithidia fasciculata* (Van Eys *et al.*, 1992). La secuencia de este gen es una de las más estudiadas, tanto es así, que se conoce en más de 100 especies (Dams *et al.*, 1988). En *L. (L.) donovani*, cepa Sudán I, la SSU ARNr tiene un tamaño de 2.204 pb (Looker *et al.*, 1988) y se encuentra más estrechamente relacionada con *C. fasciculata* (97 %, 2206 pb) (Schnare *et al.*, 1986) que con *T. brucei* (84%, 2251 pb) (Sogin *et al.*, 1986) y *T. cruzi* (2319 pb) (Hernández *et al.*, 1988, 1990). La organización atípica de la secuencia del ARNr en *T. cruzi* (Hernández *et al.*, 1988) refuerza la idea de que los tripanosomas representan un grupo de organismos eucariotas con una línea de evolución independiente (Sogin *et al.*, 1986; Tait, 1990). El

análisis de las secuencias de SSU ARNr y LSU ARNr (subunidad grande de ARNr) ha permitido estudiar la evolución de los protozoos del orden Kinetoplastida. Los géneros *Leishmania*, *Endotrypanum*, *Leptomonas*, y *Crithidia* constituirían un grupo más estrechamente relacionado, más distante de *Phytomonas* y *Blastocrithidia*, *T. cruzi* y por último de *T. brucei* (Fernandes *et al.*, 1993).

Se han utilizado sondas de alta sensibilidad, basadas en secuencias de SSU ARNr, para detectar *Leishmania* mediante "dot-blot" y PCR (menos de 10 parásitos pueden ser detectados) (Uliana *et al.*, 1991; Van Eys *et al.*, 1990, 1992). Ello ha permitido establecer la proximidad filogenética de *S. tarentolae*, exclusiva de reptiles, con *L. (L.) donovani* y por otro lado su lejanía con los tripanosomas (Briones *et al.*, 1992). El análisis de restricción de los genes SSU ARNr y LSU ARNr seguido de la hibridación con sondas complementarias de la secuencia 18S de ARNr, ha permitido diferenciar distintas especies de tripanosomatidos parásitos de insectos (Camargo *et al.*, 1992).

El-Hassan *et al.* (1993) describen un método simple de detección e identificación de diferentes especies de *Leishmania*, a partir del material de biopsia aplicado sobre nitrocelulosa, mediante PCR con los iniciadores 5'-GGTTCCTTTCCTGATTACG-3' y 5'-GGCCGGTAAAGGCCGAATAG-3' del gen SSU ARNr.

Las regiones intergénicas (espaciadoras) de los genes ribosomales (NTS), contienen secuencias especie-específicas que pueden ser utilizadas para identificar diferentes especies de *Leishmania*. Ramírez y Guevara (1987) utilizan una secuencia NTS de *L. (V.) braziliensis* Y, para diferenciar especies de *Leishmania* en relación con los patrones de RFLP, logrando diferenciar tres grupos: un primer grupo con un patrón similar a *L. (V.) braziliensis* Y y *L. (L.) garnhami* J-APT8, otro grupo similar a *L. (L.) mexicana* M-379 y un último grupo similar a *L. (V.) braziliensis* M-2903. Estos resultados apoyarían la existencia de *L. (L.) garnhami* como una especie independiente de *Leishmania*.

Guevara *et al.* (1992) no logran discriminar especies de *Leishmania* dentro del complejo de *L. braziliensis*, lo que concuerda con los resultados obtenidos previamente por Romero *et al.* (1987) y Reiner *et al.* (1989) que no logran diferenciar, ni por RFLP ni mediante isoenzimas, *L. (V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis* de Perú y Bolivia. Van Eys *et al.* (1991) no encuentran diferencias en los RFLP de las especies de *Leishmania* dentro del complejo de *L. braziliensis*.

L. (L.) mexicana y *L. (L.) amazonensis* fueron reconocidas por una sonda NTS de *L.*

(*L. garnhami* (Guevara *et al.*, 1992), resultados que concuerdan con los obtenidos mediante análisis enzimático y que sugiere una relación filogenética entre estas especies (Moreno *et al.*, 1986a).

El mini-exón es una secuencia de 25 a 39 nucleótidos añadida post-transcripcionalmente (Agabian, 1990), al extremo 5' de los ARNs mensajeros (med ARN) de todos los tripanosomatidos (Campbell *et al.*, 1984). El proceso de ligación post-transcripcional ("trans-splicing") ha sido revisado ampliamente por Laird (1989). Los genes nucleares que portan el mini-exón están organizados en tándem de 200-250 pb separados por espacios o regiones intergénicas y contienen secuencias altamente conservadas (Miller *et al.*, 1986; Wilson *et al.*, 1991; Hassan *et al.*, 1992), aunque parece que existe poca homología dentro de las regiones intergénicas.

Estos genes han sido utilizados para diferenciar especies de *Trypanosoma* como *T. cruzi* y *T. rangeli* mediante hibridaciones en forma de mancha ("dot-blot") (Murthy *et al.*, 1992) y especies de *Leishmania* (Fernandes *et al.*, 1992). La amplificación de las regiones intergénicas del med ARN de *L. (L.) donovani* mediante PCR ha permitido el desarrollo de sondas e iniciadores específicos de especie. De esta manera, se ha podido detectar *L. (L.) donovani* en tejidos y sangre de sujetos con leishmaniasis cutánea post Kala-azar (Hassan *et al.*, 1993) y diferenciar *Endotrypanum schaudinni* de *Leishmania* del Nuevo Mundo (Fernandes *et al.*, 1993).

1.4.3.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)

Las técnicas basadas en la amplificación de secuencias en el ADN genómico mediante iniciadores de secuencia variable en tamaño y elegidos al azar como: AP-PCR (20 pb) (arbitrarily primed PCR) (Welsh y McClelland, 1990), RAPD (10 a 12 pb) (random amplified polymorphic DNA) (Williams *et al.*, 1990, 1991) y DAF (6 pb) (DNA-amplified fingerprinting) (Caetano-Anolles *et al.*, 1991), han demostrado ser de gran utilidad en la caracterización de bacterias, hongos, parásitos y dípteros (ver Tabla 3).

Todos estos métodos basados en la técnica de PCR (Saiki *et al.*, 1988; Mullis *et al.*, 1986; Mullis y Faloona, 1987) utilizan un sólo nucleótido con una secuencia arbitraria a diferencia de la técnica de PCR que utiliza iniciadores específicos. Los fragmentos amplificados pueden ser utilizados como sondas en el diagnóstico y, posteriormente,

clonados y caracterizados simplificando así la búsqueda de fragmentos de ADN específicos de especie (MacPherson y Gajadhar, 1992). Algunos autores, sin embargo, piensan que es improbable que las sondas generadas mediante RAPD tengan buena sensibilidad (Wilson, 1992).

Concretamente, la técnica de RAPD se basa en la amplificación de ADN con iniciadores de 10 mers cuya secuencia es seleccionada arbitrariamente, permitiendo la discriminación de variantes intraespecíficas, así como el polimorfismo generado por diferentes mutaciones. Los fragmentos amplificados no pueden ser interpretados desde el punto de vista alélico ya que no es posible distinguir si un segmento de ADN es amplificado a partir de un "locus" heterocigótico u homocigótico. Es decir un iniciador dado amplificará un "locus" o un grupo de "loci" dados.

Meunier y Grimont (1993) han estudiado, recientemente, los factores que afectan en la reproducibilidad de la técnica RAPD.

TABLA 3.- Aplicación del método de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios en la caracterización de parásitos, bacterias, hongos y levaduras.

Organismo	Técnica*	Referencia
<u>Parásitos</u>		
- Helmintos		
<i>Echinococcus granulosus</i>	RAPD	Siles <i>et al.</i> (1993)
<i>Echinococcus</i> spp.	RAPD	Bowles y McManus (1993)
<i>Schistosoma</i> spp.	DAF	Dias-Neto <i>et al.</i> (1993); Barral <i>et al.</i> (1993)
<i>Trichinella</i> spp.	RAPD	Bandi <i>et al.</i> (1993); Dupouy-Camet <i>et al.</i> (1994a,b); Chacón <i>et al.</i> (1994); Tighe <i>et al.</i> (1994)
<i>Haemonchus</i> spp.	RAPD	Comes <i>et al.</i> (1994)
- Protozoos		
<i>Giardia duodenalis</i>	RAPD	Homan <i>et al.</i> (1992); Morgan <i>et al.</i> (1993)
<i>Trypanosoma</i> spp.	AP-PCR	Waitumbi y Murphy (1993);
	DAF	Steindel <i>et al.</i> (1993)
	RAPD	Tibayrenc <i>et al.</i> (1993); Majiwa <i>et al.</i> (1993);
<i>Trypanosoma cruzi</i>	RAPD	Revoillo <i>et al.</i> (1994); Bastrenta <i>et al.</i> (1994)
<i>Plasmodium falciparum</i>	RAPD	Tibayrenc <i>et al.</i> (1993)
<i>Leishmania</i> spp.	RAPD	Tibayrenc <i>et al.</i> (1993); Bañuls (1993), Bañuls <i>et al.</i> (1994); Baixench (1994)
- Coccidios		
<i>Eimeria</i> spp.	RAPD	Procunier <i>et al.</i> (1993); Licois <i>et al.</i> (1994)
<i>Babesia bovis</i> , <i>B. bigemina</i>	RAPD	Carson <i>et al.</i> (1994)
- Dípteros		
<i>Aedes</i> spp.	RAPD	Kambhampati <i>et al.</i> (1992)
<i>Culicoides</i> spp.	RAPD	Raich <i>et al.</i> (1993)
<i>Lutzomyia</i> spp.	RAPD	Adamson <i>et al.</i> (1993)
<u>Bacterias</u>		
<i>Escherichia coli</i>	RAPD	Bingen <i>et al.</i> (1993b)
	AP-PCR	Alos <i>et al.</i> (1993)
<i>Staphylococcus aureus</i>	RAPD	Saulnier <i>et al.</i> (1993)
	AP-PCR	Fang <i>et al.</i> (1993)
<i>Leptospira</i> spp.	AP-PCR	Ralph <i>et al.</i> (1993)
<i>Legionella pneumophila</i>	AP-PCR	Gómez-Lus <i>et al.</i> (1993)
<i>Actinobacillus</i>	AP-PCR	Hennessy <i>et al.</i> (1993)
<i>Proteus mirabilis</i>	AP-PCR	Bingen <i>et al.</i> (1993a)
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	RAPD	Palittapongarnpin <i>et al.</i> (1993)
<i>Helicobacter pylori</i>	RAPD	Akopyanz <i>et al.</i> (1992a, 1992b)
<i>Haemophilus somnus</i>	RAPD	Myers <i>et al.</i> (1993)
<i>Listeria monocytogenes</i>	RAPD	Czajka <i>et al.</i> (1993); Mazurier <i>et al.</i> (1992)
<i>Listeria</i> spp.	RAPD	Mazurier y Wernars (1992); MacGowan <i>et al.</i> (1993)
<i>Lactococcus lactis</i>	AP-PCR	Cancilla <i>et al.</i> (1992)
<i>Borrelia burgdorferi</i>	AP-PCR	Welsh <i>et al.</i> (1992)
<i>Streptococcus uberis</i>	DAF	Jayarao <i>et al.</i> (1992)
<u>Hongos y Levaduras</u>		
<i>Candida</i> spp.	RAPD	Lehmann <i>et al.</i> (1992)
<i>Aspergillus fumigatus</i>	RAPD	Aufaubre-Brown <i>et al.</i> (1992); Loudon <i>et al.</i> (1993)
<i>Histoplasma capsulatum</i>	RAPD	Woods <i>et al.</i> (1993)
<i>Leptosphaeria maculans</i>	RAPD	Goodwin y Annis (1991)

* De acuerdo a la clasificación de Meunier y Grimont (1993).

1.5. Leishmaniosis en la Cuenca Mediterránea

En la Cuenca Mediterránea, *L. (L.) infantum* es responsable de las leishmaniosis tanto cutáneas como viscerales, con una distribución típicamente rural y periurbana. El perro (*Canis familiaris*) es el principal reservorio de la leishmaniosis visceral, pero también se ha podido aislar *L. (L.) infantum* de la rata (*Rattus rattus*) y el zorro (*Vulpes vulpes*).

Los casos de leishmaniosis mucocutánea son raros en la Cuenca Mediterránea. Los primeros casos de localización labial o nasal se describieron en Italia y posteriormente en Francia (Lanotte *et al.*, 1980) y España (Alvar *et al.*, 1990). También se han descrito algunos casos de leishmaniosis laringea en Italia, Francia y Marruecos (Ranque *et al.*, 1962; Meyruey *et al.*, 1974; Lanotte *et al.*, 1980; Ravisse *et al.*, 1984). En un caso en que *Leishmania* se aisló de la mucosa nasal se realizó la caracterización enzimática, sin embargo los autores no mencionan el zimodema, sólo concluyen que la especie fue *L. (L.) infantum* (Maazoun *et al.*, 1981b). En el caso descrito en España de leishmaniosis mucocutánea, el aislado fue caracterizado como MON-1. Recientemente, Borzoni *et al.* (1991) en Cerdeña, Italia, han caracterizado un aislado de *Leishmania*, de una lesión lingual, como *L. (L.) infantum* zimodema MON-27 (víscerotropo).

En la Cuenca Mediterránea se han descrito más de 20 zimodemas de *L. (L.) infantum*, de ellos algunos se aíslan de casos de LV mientras que otros son los responsables de LC. El zimodema víscerotropo más ampliamente distribuido en los países del área Mediterránea es el zimodema 1 (MON-1), que se ha podido aislar de humanos, perros y flebotomos, si bien también se han aislado otros zimodemas viscerales. En las Tablas 4, 5 y 6 se hace una recopilación de los zimodemas que se han encontrado en aislados de *Leishmania* tanto de LVH como de LCH, así como de diferentes reservorios y especies de flebotomos, en países de la Cuenca Mediterránea.

Existen datos en la literatura acerca de la presencia de dos zimodemas diferentes en el mismo hospedador. Rioux *et al.* (1986b) describen la presencia de dos zimodemas de *L. (L.) infantum* MON-1 y MON-29 en el curso de dos episodios de LCH con tres años de intervalo. La presencia conjunta de dos zimodemas diferentes de *L. (L.) infantum*, MON-1 y MON-77, ha sido descrita por Pratlong *et al.* (1989a), en un perro con leishmaniosis cutánea difusa. Los dos zimodemas estuvieron presentes simultáneamente en la piel y en los nódulos linfáticos.

TABLA 4.- Caracterización enzimática de aislados de *L. (L.) infantum* humanos en la Cuenca Mediterránea

ZIMODEMAS*	ORIGEN	REFERENCIA
VISCERALES		
MON-1	ARGELIA FRANCIA ITALIA ESPAÑA	Belazzoug (1984, 1986a,b); Lanotte <i>et al.</i> (1981) Rioux <i>et al.</i> (1986b) Le Blancq y Peters (1986b); Gramiccia <i>et al.</i> (1992c) Portús <i>et al.</i> (1986, 1989); Alvar y Ortiz (1987); Alvar (1988); Gállego <i>et al.</i> (1993a)
	EGIPTO	Schnur (1986)
	ISRAEL	Schnur <i>et al.</i> (1981)
	MALTA	Schnur <i>et al.</i> (1981)
	TUNEZ	Lanotte <i>et al.</i> (1981); Ben Ismail <i>et al.</i> (1986)
	PORTUGAL	Abranches <i>et al.</i> (1986); Le Blancq y Peters (1986b)
	GRECIA	Le Blancq y Peters (1986b)
MON-27	ITALIA	Gramiccia <i>et al.</i> (1986)
MON-28	ESPAÑA	Portús <i>et al.</i> (1986, 1989)
MON-72	ITALIA	Gramiccia <i>et al.</i> (1992c)
MON-77	ESPAÑA	Gállego <i>et al.</i> (1993a)
MON-80	ESPAÑA	Portús <i>et al.</i> (1989)
MON-98	EGIPTO	Youssef <i>et al.</i> (1989)
CUTANEOS		
MON-1	FRANCIA ITALIA GRECIA MALTA ESPAÑA	Lanotte <i>et al.</i> (1981); Rioux <i>et al.</i> (1980, 1985, 1986b); Moreno <i>et al.</i> (1986b) Gramiccia <i>et al.</i> (1986) Frank <i>et al.</i> (1993) Gradoni <i>et al.</i> (1991) Portús <i>et al.</i> (1986, 1989); Alvar <i>et al.</i> (1990)
MON-11	FRANCIA	Lanotte <i>et al.</i> (1981); Rioux <i>et al.</i> (1986b); Moreno <i>et al.</i> (1986)
MON-24	ARGELIA ITALIA TUNEZ PORTUGAL	Belazzoug <i>et al.</i> (1985); Belazzoug (1986a,b) Gramiccia <i>et al.</i> (1986, 1987, 1992b) Pratlong <i>et al.</i> (1989); Ben Ismail <i>et al.</i> (1992) Abranches <i>et al.</i> (1994)
MON-29	ESPAÑA FRANCIA	Portús <i>et al.</i> (1982, 1986) Rioux <i>et al.</i> (1986b); Moreno <i>et al.</i> (1986b)
MON-33	ESPAÑA FRANCIA	Portús <i>et al.</i> (1989) Rioux <i>et al.</i> (1986b); Moreno <i>et al.</i> (1986b)
MON-34	FRANCIA	Rioux <i>et al.</i> (1986b); Moreno <i>et al.</i> (1986b)
MON-78	MALTA	Jolliffe <i>et al.</i> (1986); Gradoni <i>et al.</i> (1991)
MON-111	ITALIA	Gramiccia <i>et al.</i> (1992b)

* nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier (Francia).

TABLA 5.- Caracterización de aislados de *L. (L.) infantum* de diferentes reservorios

HOSPEDADOR	ZIMODEMA*	ORIGEN	REFERENCIA
PERRO	MON-1	ARGELIA	Belazzoug (1984, 1986b)
	MON-1	EGIPTO	Azab <i>et al.</i> (1984)
	MON-1	FRANCIA	Maazoun <i>et al.</i> (1981a, 1981b); Lanotte <i>et al.</i> (1981); Pratlong <i>et al.</i> (1989a)
	MON-1	GRECIA	Tzamouranis <i>et al.</i> (1984); Le Blancq y Peters (1986b)
	MON-1	ITALIA	Gramiccia <i>et al.</i> (1982 (1984, 1986, 1992b,c); Lanotte <i>et al.</i> (1981); Le Blancq y Peters (1986b)
	MON-72	"	Gramiccia <i>et al.</i> (1992c)
	MON-1	MALTA	Gradoni <i>et al.</i> (1991)
	MON-1	GOZO	Gradoni <i>et al.</i> (1991)
	MON-1	PORTUGAL	Lanotte <i>et al.</i> (1981); Abranches <i>et al.</i> (1984, 1986, 1992); Le Blancq y Peters (1986b)
	MON-1	ESPAÑA	Lanotte <i>et al.</i> (1981); Gállego y Portús (1984); Portús <i>et al.</i> (1984, 1986, 1994); Alvar y Ortiz (1987); Alvar (1988); Pratlong <i>et al.</i> (1989a); Gállego <i>et al.</i> (1993a)
	MON-77	"	Gállego <i>et al.</i> (1993a); Pratlong <i>et al.</i> (1989a)
	MON-105	"	Martín <i>et al.</i> (1994)
	MON-1	TUNEZ	Maazoun <i>et al.</i> (1981); Ben Ismail <i>et al.</i> (1986)
	MON-1	MARRUECOS	Dereure <i>et al.</i> (1986)
	MON-98	EGIPTO	Shetata <i>et al.</i> (1990)
ZORRO	-	FRANCIA	Rioux (1968, 1971)
	MON-1	PORTUGAL	Abranches <i>et al.</i> (1983, 1984); Le Blancq y Peters (1986b)
	MON-1	ITALIA	Bettini <i>et al.</i> (1980); Gramiccia <i>et al.</i> (1982)
RATA	MON-1	ITALIA	Bettini <i>et al.</i> (1978); Le Blancq y Peters (1986b); Gramiccia <i>et al.</i> (1982)
	MON-1	ESPAÑA	Morillas <i>et al.</i> (1985); González Castro <i>et al.</i> (1987)

* nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier (Francia)

TABLA 6.- Caracterización de aislados de *L. (L.) infantum* de diferentes especies de flebotomos.

VECTOR	ZIMODEMA*	ORIGEN	REFERENCIA
<i>Phlebotomus perniciosus</i>	MON-1	ITALIA	Bettini <i>et al.</i> (1986)
	MON-1	ARGELIA	Izri <i>et al.</i> (1990)
	MON-1	GOZO	Gradoni <i>et al.</i> (1991)
	MON-78	GOZO	Gradoni <i>et al.</i> (1991)
	MON-29	ESPAÑA	Rioux <i>et al.</i> (1986a)
			Gállego <i>et al.</i> (1993a)
	MON-1	"	Gállego <i>et al.</i> (1993a)
	MON-77	"	Gállego <i>et al.</i> (1993a)
	MON-105	"	Martín <i>et al.</i> (1992)
<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	MON-1	ITALIA	Maroli <i>et al.</i> (1987)
	MON-24	ARGELIA	Izri y Belazzoug (1993)
<i>Phlebotomus ariasi</i>	MON-1	FRANCIA	Rioux <i>et al.</i> (1984)
	MON-1	PORTUGAL	Pires <i>et al.</i> (1991);
	MON-24		Abranches <i>et al.</i> (1992)
	MON-1	ESPAÑA	Rioux <i>et al.</i> (1986a)
			Gállego <i>et al.</i> (1993a);
	MON-29	"	Gállego <i>et al.</i> (1993a)
<i>Phlebotomus neglectus</i>	MON-1	GRECIA	Léger <i>et al.</i> (1988)

* nomenclatura del Laboratoire d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier (Francia).

1.5.1. Leishmaniosis en España

Pittaluga (1912) describe el primer caso de kala-azar en España, en la provincia de Tarragona. Un año más tarde se describe el primer caso de leishmaniosis canina (Pittaluga, 1913). Botet y Portús (1993) han realizado una revisión histórico-bibliográfica (1912-1985) de la leishmaniosis en la España peninsular.

En España, la leishmaniosis es una enfermedad de declaración obligatoria desde 1982, si bien, en los casos de leishmaniosis cutánea y visceral en menor proporción existe una subdeclaración importante. El perro es el principal reservorio de *L. (L.) infantum* en España, calculándose que entre el 3% y 5% son seropositivos (Ministerio de Sanidad, Programa Nacional de Control de Leishmaniosis, datos no publicados).

En España se han realizado pocos trabajos de caracterización mediante isoenzimas de aislados de *Leishmania*. El primer trabajo en este sentido que apuntó que la LC está producida en nuestro país por *L. (L.) infantum* y no por *L. (L.) tropica* o *L. (L.) major* fue el de Rioux *et al.* (1980), quienes aislan y caracterizan las leishmanias de dos casos de LC en la región de los Pirineos Orientales Franceses. Dos años más tarde estos mismos autores, aislan una cepa de una LC en un sujeto procedente de Motril (Granada), demostrando tras su estudio enzimático, que se trataba de *L. (L.) infantum* (Rioux *et al.*, 1982).

Portús *et al.* (1982) caracterizan un aislado obtenido de una lesión cutánea facial en una enferma de Barcelona, que presentó un patrón enzimático idéntico a *L. (L.) donovani s.l.* salvo en un enzima. Posteriormente, estos mismos autores estudian mediante 13 sistemas enzimáticos, 9 aislados de *Leishmania* de Cataluña, 5 humanos y 4 caninos, e identifican tres zimodemas pertenecientes al complejo de *L. infantum*: MON-1, MON-28 y MON-29, este último asociado a una leishmaniosis cutánea, implicando por tanto, una vez más, a esta especie como el agente responsable del Botón de Oriente en la zona Mediterránea (Portús *et al.*, 1986).

Los trabajos de caracterización de 30 aislados de *Leishmania* (7 humanos y 23 caninos) realizados por Alvar y Ortiz (1987) y Alvar (1988) apoyan que la única especie de *Leishmania* presente en España es *L. (L.) infantum*. La caracterización enzimática de un aislado de *Leishmania* de un sujeto con afectación nasal de Palma de Mallorca como zimodema 1 (MAD-1), confirma una vez más la presencia de *L. (L.) infantum* en nuestro país incluso en lesiones atípicas (Alvar *et al.*, 1990).

Portús *et al.* (1989) analizan 16 aislados de *Leishmania*, 5 de LC y el resto de LV (dos de ellos VIH+) del área Mediterránea Occidental y encuentran 5 zimodemas diferentes: MON-1, MON-28, MON-29, MON-33 y MON-80.

1.6.- Leishmaniosis e infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH)

El primer caso de leishmaniosis asociado con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fue descrito en nuestro país en 1985 en un joven hemofílico (de la Loma *et al.*, 1985). A partir de entonces, el número de casos descritos de leishmaniosis visceral (LV) asociados a infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) se ha visto incrementado, principalmente en algunos países de la Cuenca Mediterránea como España, Italia, Francia y Portugal (Tabla 7).

Tabla 7.- Algunos trabajos publicados sobre casos de coinfección leishmania/VIH en la Cuenca Mediterránea.

País	Referencia
ESPAÑA	De la Loma <i>et al.</i> (1985); Medrano <i>et al.</i> (1986, 1992); Blázquez <i>et al.</i> (1987); Alvar <i>et al.</i> (1987, 1989a, 1992); Fernández-Guerrero <i>et al.</i> 1987); Verdejo <i>et al.</i> (1987, 1988); Yebra <i>et al.</i> (1988); Berenguer <i>et al.</i> (1989); Rivero <i>et al.</i> (1989); Ribelles <i>et al.</i> (1989); Roig <i>et al.</i> (1989); Condom <i>et al.</i> (1989); Grau <i>et al.</i> ,1989); Galofré <i>et al.</i> (1990); Montalbán <i>et al.</i> (1989, 1990a, 1990b); Altés, <i>et al.</i> (1991); Molina <i>et al.</i> (1992, 1994); Martínez <i>et al.</i> (1993).
FRANCIA	Clauvel <i>et al.</i> (1986); Bernard <i>et al.</i> (1988); Jeannel <i>et al.</i> (1989); Marty <i>et al.</i> (1989, 1991); Dellamonica <i>et al.</i> (1989); Pialoux <i>et al.</i> (1990); Datry <i>et al.</i> (1990); Pesce <i>et al.</i> (1990); Lortholary <i>et al.</i> (1990); Pratlong <i>et al.</i> 1993).
ITALIA	Senaldi <i>et al.</i> (1986); Rizzi <i>et al.</i> (1988); Vigevani <i>et al.</i> (1989); Gradoni <i>et al.</i> (1990); Gramiccia <i>et al.</i> (1992b).
PORTUGAL	Antunes <i>et al.</i> (1987); Abranches (1993).

Aproximadamente el 50% de las leishmaniosis viscerales en el adulto están asociadas con VIH y el 1-3% de los sujetos con SIDA en el Suroeste de Europa adquieren leishmaniosis visceral (Anónimo, 1991).

En España, existen unos 200 casos de esta asociación, de los cuales un 85 % tiene lugar en el grupo de riesgo de adictos a drogas por vía intravenosa. De 111 aspirados de médula ósea en sujetos VIH+ el 17% presentaron amastigotes (Alvar *et al.*, 1992). Aspectos epidemiológicos de esta asociación en España, así como la clínica y diagnóstico han sido recientemente revisados por Alvar (1994).

En el Sureste de Europa *L. (L.) infantum* es responsable de las leishmaniosis tanto cutáneas como viscerales. En España se han descrito zimodemas cutáneos y viscerales. Entre los primeros se encuentran los zimodemas ZM-1 (MON-1), ZM-29 (MON-29) y ZM-33 (MON-33) y entre los viscerales los zimodemas ZM-1 (MON-1), ZM-28 (MON-28) y ZM-80 (MON-80). En este tipo de sujetos, es común, no sólo encontrar el zimodema 1 (el más ampliamente distribuido), sino también zimodemas cutáneos en vísceras debido a la anergia en la que se encuentran estos enfermos (Portús *et al.*, 1989; Marty *et al.*, 1991; Gramiccia *et al.*, 1992b; Abranches *et al.*, 1993). En estos casos, el tropismo parece estar condicionado por la respuesta inmunológica que se establece en cada caso y no por el arquetipo bioquímico al que pertenece el aislado en cuestión (Alvar, 1994; Gradoni y Gramiccia, 1994).

En Francia, de un total de 19 aislados *Leishmania* de sujetos VIH+, 16 resultaron ser zimodema 1 (MON-1) (Marty *et al.*, 1989, 1994), 1 un zimodema dermatropo (MON-24) (Marty *et al.*, 1991) y 2 un zimodema 183, si bien el origen de estos últimos era Español (Pratlong *et al.*, 1993).

En Italia, Gradoni y Gramiccia (1990) describen un caso de LV asociado a VIH+ debido al zimodema dermatropo más comúnmente encontrado en Italia, zimodema 24 (MON-24). De un total de 8 aislados de *Leishmania* caracterizados, 2 resultaron ser MON-24, otro de los aislados se correspondió con un MON-78, zimodema dermatropo, agente productor de la LC en Malta pero no en Italia, 4 aislados fueron MON-1 y el último aislado resultó ser un nuevo zimodema MON-136, con características similares a los zimodemas dermatropos MON-78 y MON-111 (Gramiccia *et al.*, 1992b).

En Portugal, Abranches *et al.* (1993) y Campino *et al.* (1994) describen MON-24 en un caso de coinfección.

En la Tabla 8 se resumen los zimodemas cutáneos y viscerales que se han encontrado en la asociación *Leishmania* y VIH+, en diferentes países de la Cuenca Mediterránea.

Tabla 8.- Zimodemas de *L. (L.) infantum* descritos en sujetos VIH+.

Zimodemas*	País	Referencia
<u>VISCERALES</u>		
MON-1	España	Alvar <i>et al.</i> (1987); Portús <i>et al.</i> (1989); Serra <i>et al.</i> (1994); Pratlong <i>et al.</i> (1994); Riera <i>et al.</i> (1994)
	Francia	Bernard <i>et al.</i> (1988); Marty <i>et al.</i> (1989, 1994); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
		Lamaury <i>et al.</i> (1993); Rosenthal <i>et al.</i> (1993)
	Italia	Gramiccia <i>et al.</i> (1992b); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
	Argelia	Pratlong <i>et al.</i> (1994)
	Grecia	Pratlong <i>et al.</i> (1994)
	Portugal	Pratlong <i>et al.</i> (1994)
MON-28	España	Riera <i>et al.</i> (1994); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
MON-34	España	Riera <i>et al.</i> (1994)
MON-77	España	Riera <i>et al.</i> (1994); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
MON-136	Italia	Gramiccia <i>et al.</i> (1992b); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
MON-183	Francia	Pratlong <i>et al.</i> (1993, 1994); Lamaury <i>et al.</i> (1993); Riera <i>et al.</i> (1994)
<u>CUTANEOS</u>		
MON-24	Italia	Gradoni <i>et al.</i> (1990); Gramiccia <i>et al.</i> (1992b)
	Francia	Marty <i>et al.</i> (1991); Rosenthal <i>et al.</i> (1993)
	Portugal	Abranches <i>et al.</i> (1993); Campino <i>et al.</i> (1994)
	España	Riera <i>et al.</i> (1994); Serra <i>et al.</i> (1994); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
	Argelia	Pratlong <i>et al.</i> (1994)
MON-29	Francia	Lamaury <i>et al.</i> (1993)
	España	Riera <i>et al.</i> (1994)
MON-33	España	Portús <i>et al.</i> (1989); Condom <i>et al.</i> (1989); Pratlong <i>et al.</i> (1994)
	Francia	Lamaury <i>et al.</i> (1993)
MON-78	Italia	Gramiccia <i>et al.</i> (1992b)
	Argelia	Pratlong <i>et al.</i> (1994)

* nomenclatura del Laboratorio d'Ecologie Médicale et Pathologie Parasitaire, Montpellier (Francia)

OBJETIVOS

2.- OBJETIVOS

En este trabajo nos planteamos, como objetivo principal, estudiar la variabilidad de *L. (L.) infantum* y las implicaciones de la misma en la epidemiología de la leishmaniosis en España. Dada la importancia que la asociación *Leishmania*/VIH tiene en nuestro país, y con el fin de determinar si los parásitos aislados en esta asociación comparten las mismas características biológicas que aquellos responsables de las leishmaniosis habituales, nos propusimos los siguientes objetivos:

- 1.- Establecer los zimodemas de *L. (L.) infantum* presentes en la asociación *Leishmania*/VIH, en sujetos inmunocompetentes y en leishmaniosis canina, e intentar definir posibles marcadores microbiológicos asociados a las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad.
- 2.- Comparación del valor de diferentes técnicas de caracterización: análisis enzimático, sondas de ADN y amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD) en el estudio de la variabilidad de *L. (L.) infantum* y búsqueda de marcadores microbiológicos.
- 3.- Estudio de la variabilidad entre aislados de *L. (L.) infantum* de sujetos VIH+ en términos de teoría clonal y genética de poblaciones.

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1.- Material biológico

3.1.1.- Características de las cepas de referencia y aislados estudiados

Aislados caninos españoles: Se han estudiado, un total de 31 aislados caninos de *Leishmania* procedentes de diferentes áreas geográficas, incluidos en dos grupos:

A) LV (28)

B) LC (3) (dos de ellos con LV)

En la Tabla 9 se recoge el nombre, código y origen de los aislados caninos.

Aislados humanos españoles: Se han estudiado un total de 53 aislados humanos de *Leishmania* procedentes de diferentes áreas geográficas, incluidos en 5 grupos:

A) Leishmaniosis visceral (LV) asociada a VIH+ (42)

B) Leishmaniosis cutánea (LC) asociada a VIH+ (3)

C) LV asociada a otros tipos de inmunosupresión (1)

D) LV (4)

E) LC (3).

En las Tablas 10 y 11 se recoge el nombre, código y origen de los aislados de *Leishmania* de cada uno de los grupos.

Aislado humano de Angola: Denominado PAULO (MHOM/AO/91/LLM-85), corresponde al primer caso tipificado de LV de este país.

Cepas de referencia de *L. (L.) infantum* correspondientes a zimodemas presentes en España: LEM-75 (MON-1), BCN-65 (MON-28), LEM- 307 (MON-29), LEM-356 (MON-33), BCN-32 (MON-33), LEM-425 (MON-80).

Cepas marcadores de especie del Viejo Mundo: *L. (L.) major* (LRC-137, 5-ASKH), *L. (L.) tropica* (K-27, LRC-32), *L. (L.) aethiopica* (LRC-147), *L. (L.) donovani* (DD8, LRC-133), *L. (L.) infantum* (IPT-1).

Cepas marcadores de especie del Nuevo Mundo: *L. (V.) braziliensis* (M- 2903), *L. (V.) guyanensis* (M-1176), *L. (L.) mexicana* (M-379), *L. (L.) amazonensis* (PH-8), *L. (L.) chagasi* (PP-75).

Otros tripanosomátidos: *Crithidia fasciculata*, *Endotrypanum schaudinni*, *Herpetomonas muscarum*, *Leptomonas ctenocephali* y *Sauroleishmania tarentolae*.

En la Tabla 12 se recoge el código, hospedador, tipo de lesión y origen de todas las cepas de referencia y otros tripanosomátidos.

3.1.2.- Aislamiento

Los parásitos se aislaron en medio bifásico NNN, en el caso de LV humanas, a partir de aspirados de médula ósea, monocitos de sangre periférica (Gutiérrez-Solar, 1992), sangre periférica total, punción esplénica y xenodiagnóstico indirecto (Molina *et al.*, 1992; Molina *et al.*, 1994a), y en el caso de LC de biopsias de piel. Los aislados caninos se obtuvieron a partir de punción de ganglio poplíteo, aspirados de médula ósea, monocitos de sangre periférica (Gutiérrez-Solar, 1992) y xenodiagnóstico directo (Molina *et al.*, 1994b) en el caso de LV y de biopsia de piel cuando se trataron de LC. Los cultivos se mantuvieron a 28° C y se examinaron semanalmente, durante 4 semanas, con el fin de confirmar la presencia o ausencia de promastigotes en los mismos.

Medio NNN (Novy-McNeal-Nicolle)

Preparación del agar:

- Bacto-agar (Difco)..... 14 g
- NaCl (Merck)..... 6 g
- Agua destilada c.s.p.....900 ml

Llevar a ebullición y esterilizar en autoclave a 120°C y 1 atmósfera durante 20 minutos. Almacenar a 4°C hasta su utilización.

Preparación de los tubos:

Fundir el agar y dejar descender su temperatura hasta 50°C. A continuación añadir a cada tubo y en el siguiente orden:

- Solución de antibióticos.....100 µl
- Sangre de conejo desfibrinada.....1 ml
- Agar.....2 ml

Agitar los tubos suavemente y disponer en plano inclinado hasta solidificación del agar.
Conservar a 4°C hasta su utilización.

Solución de antibióticos (Bio-Whitaker):

20.000 UI/ml de penicilina

20.000 µg/ml de estreptomicina

3.1.3.- Cultivo en masa

Los promastigotes una vez aislados en medio NNN, se cultivaron en masa a 28°C en medio RPMI 1640 (Gibco), suplementado con un 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado 1 h a 56°C y antibióticos, con el fin de conseguir leishmanias en cantidad suficiente para la realización de todas las pruebas.

Medio RPMI:

Medio RPMI 1640 (Gibco) con L-glutamina y sin bicarbonato.

- RPMI 1640.....10'4 g

- Agua destilada estéril.....960 ml

a continuación añadir:

- HEPES (Sigma)5'95 g

- NaHCO₃.....2 g/l

ajustar el pH a 7'4 y esterilizar por filtración (0'22 µm). Conservar a 4°C.

A 500 ml del medio así preparado añadir:

- SBF.....70 ml

- Solución de antibióticos..... 2 ml

3.1.4.- Congelación

Para su congelación los promastigotes se concentraron por centrifugación (1000g, 5

min.), se retiró el sobrenadante y los parásitos se resuspendieron en 5 ml de medio de congelación. A continuación se distribuyeron en alícuotas en criotubos, a razón de 1 ml/tubo, manteniéndose 2 h a 4°C y 24 h a - 70°C, antes de ser almacenados en N₂ líquido.

Medio de congelación:

- RPMI 1640 (Gibco).....3'5 ml
- SBF.....0'5 ml
- Dimetilsulfóxido (Merck).....1 ml

3.1.5.- Descongelación

Los criotubos se descongelaron por inmersión en baño a 37°C, se centrifugaron (1000g, 5 min.) eliminándose a continuación el sobrenadante y añadiendo 0'1-0'2 ml de medio RPMI 1640 completo. Finalmente, el volumen final se repartió en dos tubos de medio NNN.

TABLA 9.- Características de los aislados caninos.

AISLADOS	CODIGO	ORIGEN
A) LV		
- Médula		
Boxer*	MCAN/ES/92/LLM-360	Madrid
Pastor	MCAN/ES/92/LLM-369	Madrid
Caza	MCAN/ES/92/LLM-374	Aranjuez (Madrid)
Dócil*	MCAN/ES/92/LLM-375	Aranjuez (Madrid)
Chata*	MCAN/ES/92/LLM-368	Cantoblanco (Madrid)
Orejas	MCAN/ES/92/LLM-367	Valdepeñas (C. Real)
Pointer	MCAN/ES/92/LLM-358	Zaragoza
Doberman	MCAN/ES/92/LLM-359	Zaragoza
Belga	MCAN/ES/92/LLM-363	Zaragoza
Perdiguero	MCAN/ES/92/LLM-365	Zaragoza
- Ganglio poplíteo		
Blanco	MCAN/ES/91/LLM-342	Torrelodones (Madrid)
Canto	MCAN/ES/91/LLM-343	Manzanares (Madrid)
Oso	MCAN/ES/91/LLM-344	Colmenarejo (Madrid)
Dora	MCAN/ES/91/LLM-345	Algete (Madrid)
37-G	MCAN/ES/92/LLM-348	Cantoblanco (Madrid)
Algete	MCAN/ES/91/LLM-84	Algete (Madrid)
Tarzán	MCAN/ES/87/LLM-32	Mallorca
Yocki	MCAN/ES/83/LLM-16	Madrid
Wiska	MCAN/ES/83/LLM-20	Alcalá de Henares (Madrid)
Betty	MCAN/ES/85/LLM-17	Madrid
Tuc	MCAN/ES/83/LLM-298	Mallorca
- Monocitos de sangre periférica		
Tarcris	MCAN/ES/93/LLM-393	Aranjuez (Madrid)
Tímido*	MCAN/ES/92/LLM-361	Cantoblanco (Madrid)
37-B	MCAN/ES/92/LLM-347	Cantoblanco (Madrid)
30-B	MCAN/ES/91/LLM-350	Cantoblanco (Madrid)
- Xenodiagnóstico		
Orejas	MCAN/ES/92/LLM-367	Valdepeñas (C. Real)
Belga	MCAN/ES/92/LLM-363	Zaragoza
Perdiguero	MCAN/ES/92/LLM-365	Zaragoza
B) LC		
- Piel		
Curro	MCAN/ES/92/LLM-376	Aranjuez (Madrid)
37-P	MCAN/ES/92/LLM-346	Cantoblanco
30-P	MCAN/ES/91/LLM-349	Cantoblanco

* Asintomáticos (M): Madrid

TABLA 10.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunosuprimidos

AISLADOS	GRUPO DE RIESGO	GRUPO VIH DEL CDC ^a	CODIGO	ORIGEN
A) LV y VIH+				
- Médula				
Antonio	ADVP	-	MHOM/ES/88/LLM-150	Cuenca
Daniel	-	-	MHOM/ES/88/LLM-175	Madrid
58140	-	-	MHOM/ES/90/LLM-195	Madrid
59933	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/90/LLM-200	Madrid
Milagros	-	-	MHOM/ES/88/LLM-180	Madrid
Jesús	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/88/LLM-190	Cuenca
5825	-	-	MHOM/ES/91/LLM-205	Madrid
Espín	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-335	Madrid
Garrido	Hemofilico	IVC-2	MHOM/ES/92/LLM-336	Jaén
Tejucar	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-304	Madrid
Carrasco	-	II	MHOM/ES/92/LLM-320	Mallorca
Anastasio	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-312	Madrid
Antunez	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-313	Madrid
Palma	-	-	MHOM/ES/91/LLM-310	Mallorca
Cuadros*	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-340	Madrid
Justo	Heterosexual	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-341	Fuentidueña (M)
Clemente	ADVP	II	MHOM/ES/91/LLM-301	Madrid
Natalio	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-311	Madrid
Massa	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-299	Mallorca
Ribas	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-300	Mallorca
Esteso	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-306	Madrid
Angel	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-316	Vallecas (Madrid)
Armenteros	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-315	Madrid
Arroyo	-	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-303	Fuenlabrada (M)
Cejas	Homosexual	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-330	Mallorca
Enrique	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-331	Madrid
Francisco	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-309	Alicante
Tomás	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-326	Madrid
Moreno	ADVP	IVC-2	MHOM/ES/93/LLM-384	Madrid
Lara	ADVP	-	MHOM/ES/93/LLM-382	Córdoba
Berger	Homosexual	IVD	MHOM/ES/93/LLM-383	Madrid
Leonor*	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-386	Madrid
Vélez	Homosexual	II	MHOM/ES/92/LLM-373	Madrid
Ana	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-325	Madrid
- Punción esplénica				
Arce	ADVP	-	MHOM/ES/92/LLM-370	Alicante

* Asintomático

a: CDC (Centers for Disease Control) (1986, 1987)

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral

(M): Madrid

TABLA 10.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunosuprimidos (continuación).

AISLADOS	GRUPO DE RIESGO	GRUPO VIH DEL CDC ^a	CODIGO	ORIGEN
A) LV y VIH+				
- Monocitos de sangre periférica				
Rojas	ADVP	II	MHOM/ES/92/LLM-337	Madrid
Manu	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-323	Madrid
Mora	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-372	St ^a Eugenia (M)
Puma	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-389	Madrid
- Sangre total				
Lova	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-339	Vicálvaro (M)
- Xenodiagnóstico				
Santo	ADVP	IVC-2	MHOM/ES/91/LLM-47	Madrid
Jiro	Heterosexual	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-333	Cuenca
B) LC y VIH+				
- Biopsia de piel				
Oscar	ADVP	-	MHOM/ES/88/LLM-116	Madrid
Egido	Homosexual	-	MHOM/ES/93/LLM-394	Madrid
Navarro*	ADVP	-	MHOM/ES/93/LLM-395	Madrid
C) LV y otro tipo de inmunosupresión				
- Médula				
Elena			MHOM/ES/91/LLM-329	Madrid

* Asintomático

a: CDC (Centers for Disease Control (1986, 1987)

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral

(M): Madrid

TABLA 11.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunocompetentes.

AISLADOS	CODIGO	ORIGEN
D) LV - Médula		
Azañedo	MHOM/ES/87/LLM-33	Segovia
Seguí	MHOM/ES/91/LLM-327	Menorca
Kalay	MHOM/ES/93/LLM-391	Madrid
- Xenodiagnóstico		
Lang	MHOM/ES/93/LLM-392	Boadilla (Madrid)
E) LC - Biopsia de piel		
Javier	MHOM/ES/92/LLM-332	Tres Cantos (Madrid)
Zamora	MHOM/ES/92/LLM-318	Madrid
Arenas	MHOM/ES/92/LLM-317	Móstoles (Madrid)

TABLA 12.- Características de las cepas de referencia de L. (L.) infantum, cepas marcadores de especie del Viejo Mundo, cepas marcadores de especie del Nuevo Mundo y otras especies de tripanosomátidos.

<u>Cepas de referencia L.(L.) infantum</u>	<u>CODIGO</u>	<u>HOSPEDADOR</u>	<u>TIPO DE LESION</u>	<u>ORIGEN</u>	<u>ZM</u>
LEM-75	MHOM/FR/78/LEM-75	HUMANO	LV	Francia	1
LEM-307	MHOM/ES/81/BCN-1	HUMANO	LC	Barcelona	29
BCN-65	MHOM/ES/91/BCN-65	HUMANO (VIH+)	LV	Barcelona	28
LEM-356	MHOM/FR/82/LEM-356	HUMANO	LC	Francia	33
BCN-32	MHOM/ES/89/BCN-32	HUMANO (VIH+)	LV	Barcelona	33
LEM-425	MHOM/DZ/837LEM-425	HUMANO	LC	Argelia	80
<u>Cepas de referencia del Viejo Mundo</u>					
<u>L. (L.) donovani</u> (LRC-133)	MHOM/ET/67/HU3	HUMANO	LV	Etiopía	18
<u>L. (L.) donovani</u> (DD8)	MHOM/IN/80/DD8	HUMANO	LV	India	2
<u>L. (L.) aethiopica</u> (LRC-147)	MHOM/ET/72/L100	HUMANO	LCD	Etiopía	14
<u>L. (L.) tropica</u> (LRC-32)	MHOM/IQ/65/AV-SINAI I	HUMANO	LC	Iraq	39
<u>L. (L.) tropica</u> (K-27)	MHOM/SU/74/K-27	HUMANO	LC	Sudán	60
<u>L. (L.) major</u> (LRC-137)	MHOM/IL/67/JERICHOII	HUMANO	LC	Israel	26
<u>L. (L.) major</u> (5-ASKH)	MHOM/SU/73/5-ASKH	HUMANO	LC	Sudán	4
<u>L. (L.) infantum</u> (IPT-1)	MHOM/TN/80/IPT-1	HUMANO	LV	Túnez	1
<u>Cepas de referencia del Nuevo Mundo</u>					
<u>L.(V.) braziliensis</u>	MHOM/BR/75/M-2903	HUMANO	LC	Brasil	43
<u>L.(V.) guyanensis</u>	MHOM/BR/70/M-1176	HUMANO	LC	Brasil	-
<u>L.(L.) mexicana</u>	MNYC/BZ/62/M-379	<u>Nyctomys</u> sp.	LC	Belize	40
<u>L.(L.) amazonensis</u>	IFLA/BR/67/PH8	<u>Lutzomyia</u> sp.	LC	Brasil	41
<u>L.(L.) chagasi</u>	MHOM/BR/74/PP-75	HUMANO	LV	Brasil	-
<u>Otros tripanosomátidos</u>					
<u>Leptomonas ctenocephali</u>	ITMAP 1905	INVERTEBRADO			
<u>Endotrypanum schaudinni</u>		INVERTEBRADO			
<u>Herpetomonas muscarum</u>	LRC-L130 (ITMAP 1902)	INVERTEBRADO			
<u>Crithidia fasciculata</u>		INVERTEBRADO			
<u>Sauroleishmania tarentolae</u>	WR-144	INVERTEBRADO			

3.2.- Caracterización enzimática

La caracterización enzimática se llevó a cabo en geles gruesos de almidón mediante un sistema de electroforesis horizontal, en cubetas LKB, siguiendo los protocolos descritos previamente (Maazoun *et al.*, 1981b; Moreno *et al.*, 1986b; Alvar, 1988), con algunas modificaciones.

3.2.1.- Sistemas enzimáticos

El análisis enzimático se realizó mediante quince sistemas enzimáticos que permiten el estudio de 16 "loci": MDH, EM, ICD, 6PG, G6P, GLUD, DIA, NP, GOT, MPI, PGM, FH, GPI, SOD. Los sistemas enzimáticos NP y SOD permiten la visualización de 2 loci. El "loci" con mayor migración se designa como NP₂ y SOD₂ y el de menor migración como NP₁ y SOD₁. Los nombres y códigos de cada uno de los sistemas enzimáticos estudiados se muestran en la Tabla 13.

TABLA 13.- Nombre y código de identificación de los enzimas estudiados.

ENZIMA	NOMBRE ABREVIADO	CODIGO#
Malato deshidrogenasa	MDH	E.C. 1.1.1.37
Enzima málico	EM	E.C. 1.1.1.40
Isocitrato deshidrogenasa	ICD	E.C. 1.1.1.42
6-Fosfogluconato deshidrogenasa	6PG	E.C. 1.1.1.44
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	G6P	E.C. 1.1.1.49
Glutamato deshidrogenasa	GLUD	E.C. 1.4.1.3
Diaforasa	DIA	E.C. 1.6.2.2
Nucleosil fosforilasa	NP	E.C. 2.4.2.1
Glutamato oxalacetato transaminasa	GOT	E.C. 2.6.1.1
Manosa fosfato isomerasa	MPI	E.C. 5.3.1.8
Fosfoglucomutasa	PGM	E.C. 2.7.5.1
Fumarato hidratasa	FH	E.C. 4.2.1.2
Glucosa fosfato isomerasa	GPI	E.C. 5.3.1.9
Superóxidodismutasa	SOD	E.C. 1.15.1.1

Número de la Comisión de Nomenclatura de Enzimas.

3.2.2.- Preparación de los geles

Para la preparación de los geles se disolvieron 20'5 g de almidón (21 g para los enzimas MDH, EM y SOD) en 200 ml de tampón de gel A, B, C ó D, dependiendo de los enzimas a estudiar de acuerdo con la Tabla 14, calentándose en agitación continua hasta que la consistencia fue viscosa. A continuación se desgasificaron con bomba de vacío y se dispusieron sobre un cristal limitado por tres marcos de metacrilato superpuestos. En la parte superior, se colocó otro cristal y un peso de aproximadamente 1 Kg. Se dejaron solidificar y se guardaron hasta el día siguiente a temperatura ambiente, cubiertos con un plástico. En la Tabla 14 se muestra la composición de los tampones de migración y del gel utilizados con cada sistema enzimático.

TABLA 14.- Tampones requeridos para cada sistema enzimático.

ENZIMA	TAMPON DE MIGRACION	TAMPON DE GEL
G6P 6PG	Tris 0'1 M-Ác. Málico 0'1 M EDTA 0'01 M-MgCl ₂ . 6H ₂ O 0'001 M (TME) pH 7'4	A: NADP 1% (5 ml) TME pH 7'4 (45 ml) Agua destilada c.s.p. 400 ml
PGM GPI GOT ICD	Tris 0'1 M-Ác. Málico 0'1 M EDTA 0'01 M-MgCl ₂ . 6H ₂ O 0'001 M (TME) pH 7'4	B: NAD 1% (5 ml) TME pH 7'4 (45 ml) Agua destilada c.s.p. 400 ml
NP1 NP2 MPI DIA GLUD	Tris 0'661 M-Ác. cítrico 0'083 M (TC) pH 8'6 *	C: NADP 1% (4 ml) TC pH 8'6 (18'7) Agua destilada c.s.p. 400 ml
MDH ME SOD	Tris 0'13 M-Ác. cítrico 0'043 M (TC) pH 9'4 *	D: NAD 1% (4 ml), Na ₂ HPO ₄ 0'5g TC pH 9'4 (40 ml) Agua destilada c.s.p. 400 ml
FH	Tris 0'1 M-Ác. Málico 0'1 M MgCl ₂ . 6H ₂ O 0'001 M (TM) pH 7'4	E: TM pH 7'4 (50 ml) Agua destilada c.s.p. 400 ml

* el pH se ajustó con ácido cítrico o NaOH. En el resto de los tampones así como en los tampones de gel A, B, C, D y E el pH se ajustó con NaOH o HCl

3.2.3.- Preparación de los extractos enzimáticos

Los promastigotes de cada una de las cepas de referencia y aislados estudiados se cultivaron en medio RPMI 1640 (GIBCO), suplementado con 10% de suero bovino fetal, recolectándose en fase logarítmica de crecimiento por centrifugación a 4°C (2.000 g, 10 min.). Cada uno de los sedimentos, conteniendo 10×10^8 leishmanias, se lavó en PBS y se centrifugó a 4°C (2.000 g, 10 min.) tres veces. Finalmente, se resuspendieron en PBS y se trasladaron a tubos eppendorf, siendo centrifugados a 12.300 g/10 min. Posteriormente, se retiró el sobrenadante y los "pellets" se conservaron a -70°C hasta su utilización.

Para la extracción de los enzimas solubles los sedimentos se descongelaron, manteniéndolos a 4°C, tratándose en homogenizadores de cristal, con un detergente no iónico, Tritón X-100 (Sigma) al 5% en sacarosa 0'25 M, en cantidad igual a la del sedimento. En el extracto resultante se impregnaron unos papelitos de nitrocelulosa de 0,22 μ m, que posteriormente se insertaron con ayuda de un peine en el soporte de almidón.

3.2.4.- Electroforesis

El peine fue retirado una vez insertados los papelitos impregnados con cada uno de los extractos enzimáticos. En cada uno de los compartimentos de la cubeta se depositó un litro del tampón de migración. El gel se dispuso en la cubeta y a continuación se colocaron unas esponjas, con el fin de facilitar el paso del tampón de migración a través del gel.

En la Tabla 15 se resumen las condiciones de electroforesis para cada enzima.

Tabla 15.- Condiciones de desarrollo de electroforesis para cada uno de los enzimas estudiados.

NOMBRE ABREVIADO	TAMPON DE MIGRACION	VOLTAJE (voltios)	TIEMPO DE DESARROLLO
MDH EM SOD	TC pH 9'4	100	6 horas
NP MPI GLUD DIA	TC pH 8'6	100	6 horas
G6P 6PG	TME pH 7'4 (NADP)	100	4 horas
ICD GOT GPI PGM	TME pH 7'4 (NAD)	100	4 horas
FH	TM pH 7'4	100	4 horas

3.2.5.- Revelado

Finalizada la electroforesis el gel se cortó longitudinalmente en tres capas, permitiendo así el estudio simultáneo de tres enzimas. A continuación se añadió sobre los geles el sustrato específico del enzima a analizar, coenzima, enzimas de acoplamiento, iones adicionales y sistemas de visualización necesarios para que tenga lugar la reacción catalizada por el enzima.

En todos los casos el sustrato, coenzima, iones adicionales y NBT (azul de nitro tetrazol) se disolvieron en el tampón de revelado y la solución se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se añadieron sobre esta solución los enzimas de acoplamiento, fenazinametasulfato (PMS) y agar al 2% (previamente atemperado a 60 °C) vertiéndose inmediatamente sobre los geles. El revelado se realizó a 37 °C y en oscuridad. Las condiciones de revelado fueron las descritas por Maazoun *et al.* (1981b), Moreno *et al.* (1986b) y Selander *et al.* (1986) con algunas modificaciones.

En la Tabla 16 se recogen las condiciones de revelado para cada uno de los enzimas.

Una vez que las bandas se hicieron visibles, la reacción se bloqueó con una solución fijadora.

Solución de fijación:

Etanol (Merck).....	1.000 ml
Ácido acético (Merck).....	400 ml
Glicerol (Merck).....	200 ml
Agua destilada.....	200 ml

3.2.6.- Interpretación de los resultados

A continuación se determinó la distancia de migración desde el punto en el que se aplicó la muestra hasta el centro de la banda. Esta distancia se comparó con la obtenida para la cepa de referencia MHOM/FR/78/LEM-75 (Chance, 1986). La movilidad relativa de un determinado electromorfo vendrá dada por la siguiente fórmula (Maazoun *et al.*, 1981b; Lanotte *et al.*, 1981).

$$X = \frac{dX}{dR} \times 100$$

X = movilidad relativa de la banda X

dX = distancia desde el origen a la banda X

dR = distancia desde el origen a la banda para la cepa de referencia

El cálculo de la movilidad relativa para cada una de las bandas permite la construcción de un zimógrafo. Finalmente, los geles se fotografiaron con una cámara Polaroid (película 665).

TABLA 16. - Condiciones de revelado para cada uno de los enzimas.

ENZIMA	TAMPÓN DE ^a REVELADO	SUSTRATO ^b	COENZIMA ^c	IONES ^d ADICIONALES	ENZIMAS DE ^e ACOPLANAMIENTO	MÉTODO DE ^f VISUALIZACIÓN	T ^g REVELADO
G6P	Tris-HCl 0'2 M pH 8 10 ml	Glucosa-6P 20 mg	NADP 1% 1 ml	EDTA 10 mg	-	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
6PG	Tris-HCl 0'2 M pH 8 10 ml	Ac-6-fosfo- glucónico 40 mg	NADP 1% 1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'5 M (1 ml)	-	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
MDH*	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	Solución A*	NAD 1% 1 ml	NaH ₂ PO ₄ 10 mg	-	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
EM*	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	Solución A*	NADP 1% 1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'5 M (1 ml)	-	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
SOD	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	-	NAD 1% 2 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'1 M (2 ml)	-	MTT 1.25 % (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
GPI	Tris-HCl 0'2 M pH 8 10 ml	Fructosa- 6-fosfato 10 mg	NAD 1% 1 ml NADP 1% 1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'5 M (1 ml)	G6PDH 16 U	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	4°C
PGM	Tris-HCl 0'2 M pH 8 10 ml	Glucosa-1- fosfato 300 mg	NAD 1% 1 ml NADP 1%	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'5 M (1 ml)	G6PDH 16 U	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
GOT ^g	Tris-HCl 0'2 M pH 8 50 ml	Ó-Cetogluta- rato (100 mg) Ác. aspártico (200 mg) Piridoxal-5- fosfato (10 mg)	-	-	-	Fast-Blue BB (200 mg) Tris-ClH 0'2 M 50 ml	T ^g ambiente
ICD	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	Ác. isocítrico 0'1 M (4 ml)	NADP 1% 1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'25 M (1 ml) MnCl ₂ .4H ₂ O 10 mg	-	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
NP ₁ NP ₂	Tris-HCl 0,2 M pH 8 8 ml	Inosina 10 mg	-	-	Xantín- oxidasa 2 U	PMS 1% (1 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C

TABLA 16.- Condiciones de revelado para cada uno de los enzimas (continuación).

ENZIMA	TAMPÓN DE ^a REVELADO	SUSTRATO ^b	COENZIMA ^c	IONES ^d ADICIONALES	ENZIMAS DE ^e ACOPLAMIENTO	MÉTODO DE ^f VISUALIZACIÓN	T ^a REVELADO
DIA	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	2,6 dicloro- fenol-indofe- nol 1 mg/1 ml de Tris-ClH 0'2 M pH 8	B-NADH 10 mg	-	-	MTT (5 mg) Agua destilada (2 ml) Tris-ClH 0'2 M pH 8 (2 ml) Agar 2% (10 ml)	37°C
NPI	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	Manosa-6-P 10 mg	NADP 1% 1 ml	MgCl ₂ .6H ₂ O 0'2 M (1 ml)	G6PDH 33 U PGI 50 U	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (1 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
GLUD	Tris-HCl 0'2 M pH 8 10 ml	Ác. L-glutá- mico 200 mg	NADP 1% 1 ml	-	-	PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C
FH	Tris-HCl 0'2 M pH 8 8 ml	Ác. fumárico 580 mg Piruvato Na 20 mg	NAD 1% 3 ml	-	MDH 50 U	NBT 1% (1 ml) PMS 1% (0'5 ml) Agar 2% (5 ml)	37°C

a: Disolver 24'2 g de Tris (Merck) en 1000 ml de agua destilada; ajustar el pH 8 con HCl.

b: Todos los sustratos utilizados fueron suministrados por Sigma Chemical Co..

Solución A': Disolver 3'10 g de Na₂CO₃ anhidro (Merck) en 15 ml de agua destilada. Después de su disolución, disponer en baño de hielo. Añadir lentamente 3'35 g de ácido málico (Sigma). después de su disolución, añadir 10 ml de agua destilada. Ajustar el pH 7 con una solución de NaOH.

c: NAD 1% y NADP 1% : 1 g de NAD y 1 g de NADP (Boehringer-Mannheim Biochemicals) en 100 ml de agua destilada.

d: MgCl₂.6H₂O (Merck) 0'5 M: disolver 10'15 g en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.

MgCl₂.6H₂O (Merck) 0'1 M: disolver 4'06 g en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C.

e: Los enzimas empleados fueron suministrados por Sigma Chemical Co. y Boehringer-Mannheim Biochemicals.

f: NBT 1% (Azul de nitro tetrazol, Sigma): 1 g en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C y en oscuridad.

PMS 1% (Fenazina-metasulfato, Sigma): 1 g en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C y en oscuridad.

MTT 1'25% (dimetiltiazol tetrazol, Sigma): 1'25 g en 100 ml de agua destilada. Conservar a 4°C y en oscuridad.

Agar 2%: 2 g de Bacto-Agar (Difco), 50 ml de Tris-HCl 0'2 M de pH 8, 50 ml de de agua destilada.

g: Los sustratos disueltos en el tampón de revelado se añaden sobre el gel, tras incubación a temperatura ambiente y en oscuridad durante 30 minutos se añade el Fast-blue disuelto en 50 ml de Tris-HCl 0'2 M pH 8. En cuanto las bandas comienzan a salir se lava el gel con Tris-HCl 0,2 M pH 8 y se añade la misma solución.

*: En algunos casos, el EM y MDH se revelaron a la vez añadiendo 1 ml de NAD 1% al sustrato del EM.

3.3.- Caracterización mediante sondas de ADN

3.3.1.- Extracción de ADN

El protocolo seguido fue fundamentalmente el descrito por Barker *et al.* (1986a), con algunas modificaciones.

Los promastigotes de cada uno de los aislados y de las cepas de referencia se concentraron por centrifugación (10 min., 4°C, 2000 g), determinándose el número de promastigotes tras tres lavados en NET-100 1x (10 min, 4°C, 2000 g). A continuación, se lisaron a 60°C durante 1 h en un volumen de 0.7 ml de NET-100 1x/1 x 10⁹ promastigotes y 0.3 ml de sarcosil 10% en NET-100/1 x 10⁹ promastigotes (el lisado de leishmanias, así preparado se puede conservar a - 20°C). Seguidamente, y con el fin de eliminar el ARN contaminante, se llevó a cabo una digestión a 37°C, durante 15 min., con una solución de ribonucleasa (RNAsa)(Sigma) a razón de 1 mg/ml de lisado. Finalizado el tratamiento con RNAsa, se digirió a 37°C durante 2 h con una solución de proteinasa K a razón de 1 mg/ml de lisado. Posteriormente se añadió a cada uno de los lisados 4-amino-salicilato sódico (Analar) 5% p/v y deoxicolato sódico (Analar) 1% p/v, manteniendo a temperatura ambiente 1 h (se puede dejar así toda la noche). Transcurrido este tiempo cada una de las muestras se pasó por agujas de 25 g y se depositó en tubos de 25 ml, utilizándose NET-100 para su equilibrado. A continuación se realizó una centrifugación de 1 h a 50.000 g y 5°C, en ultracentrifuga SORWALL (rotor SS-34). Seguidamente se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 500 µl de TE 1x. Después de su homogenización el volumen se completó hasta 4 ml con TE 1x.

3.3.1.1.- Separación de ADNg y ADNk mediante gradiente de densidad en Cloruro de cesio (CsCl)/Bromuro de etidio (EtBr)

El índice de refracción de cada solución se ajustó a 1.386° mediante un refractómetro, añadiendo 1.1 g/ml de cloruro de cesio y 200 µl de una solución de bromuro de etidio (10mg/ml). Seguidamente se pasó cada una de las soluciones a tubos cónicos para rotor VTi-80 (Beckman), calibrándose con TE 1x. Los tubos se sellaron y se dispusieron en el rotor (VTi-80), centrifugándose a 220.000 g a 15°C durante 18 h. Finalizado el tiempo de centrifugación se comprobó la presencia de bandas de ADNg y ADNk en un transiluminador de luz ultravioleta. Con ayuda de una jeringa se recogió cada una de las

bandas y se eliminó el EtBr tratando varias veces con una mezcla de Isobutanol/TE y agitando con fuerza. Las muestras se dializaron frente a 3 litros de agua destilada durante toda la noche para eliminar el CsCl. El ADNg y ADNk contenido en la fase acuosa se pasó a tubos Corex (tratados con dimetil-diclorosilano durante 5 min. en campana de vapores) y se precipitó mediante la adición de 1 volumen de acetato sódico 0'3 M y 2'5 volúmenes de etanol frío (-20° C) e incubación a -20° C durante toda la noche o bien 1 h a -70° C. Para separar el ADN la suspensión se centrifugó a 12.000 g, 4° C durante 45 min. en centrífuga SORWALL (rotor SS-34). El precipitado una vez desecado por vacío se resuspendió en 100 µl de TE y se conservó a 4° C.

3.3.1.2.- Reactivos y soluciones necesarias para la extracción del ADN

- NET-100 1x

NaCl (Merck) 0'1 M.....5'84 g

EDTA (Merck) 0'1 M.....37'20 g

Tris (Merck) 0'01 M.....1'21 g

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 8, utilizando NaOH 5 M. Completar el volumen final hasta 1000 ml. Esterilizar en autoclave 20 min. a 120° C y 1 at.

- Sarcosil (N-lauryl-sarcosine) (Sigma) 10% en NET-100 1X, pH 8

- Solución stock de ribonucleasa A, tipo III A (Sigma), 10 mg/ml

Disolver en Tris-HCl 10 mM pH 7'5 y NaCl 15 mM. Calentar a 100° C 15 min. Dejar enfriar a Tª ambiente, hacer alícuotas y almacenar a -20° C.

- Solución stock de pronasa (proteínasa K, Sigma) 20 mg/ml

Calentar a 80° C durante 10 min. Enfriar a 37° C 1 h. Hacer alícuotas y almacenar a -20° C.

- Tampón básico para DNA: TE

Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8.

Esterilizar en autoclave 20' a 120°C y 1 at.

- Isobutanol (Merck)/TE

Mezclar a partes iguales y dejar en reposo a temperatura ambiente.

- Membranas de diálisis (Serva tipo 20/32)

Cortar las membranas de unos 25 cm de largo. Para equilibrarlas, hervir 10 min. en un volumen de NaHCO₃ al 2% y EDTA 1 mM. Aclarar en agua destilada. Hervir 10 min. en EDTA 1 mM. A continuación, dejar enfriar y almacenar a 4°C, asegurándose de que las membranas estén bien sumergidas. Cuando se vayan a utilizar, aclarar con agua destilada.

- Acetato sódico 3M (Merck)

CH₃-COONa (Merck).....24'6 g

Agua destilada c.s.p.....100 ml

Esterilizar en autoclave 20' a 120°C y 1 at.

- Bromuro de Etidio (10 mg/ml)

1 g de Bromuro de etidio (Sigma) en 100 ml de agua destilada. Conservar en oscuridad.

3.3.2.- Cuantificación de ADN

La concentración del ADN en solución se estimó en un espectrofotómetro a 260 nm, sabiendo que 1 D.O. de ADN de doble cadena equivale a 50 µg/ml. La relación de pureza se obtuvo mediante el cociente de las lecturas a 260 nm y 280 nm (los valores comprendidos entre 1'8 y 2 se corresponden con ADN puro) (Sambrook *et al.*, 1989).

3.3.3. - Digestión de ADNg y ADNk con endonucleasas

Las digestiones de los ADNs (ADNg y ADNk) con enzimas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones de la casa comercial (Boehringer-Mannheim).

En cada digestión se partió de una cantidad de 4 μ g de ADNg y 5-10 μ g de ADNk en un volumen final de 50 y 120 μ l respectivamente, utilizándose las unidades de enzima necesarias e incubándose a 37 °C durante toda la noche.

El ADNk de cada uno de los aislados, así como de las cepas de referencia, se digirió con el enzima de restricción Hae III y el ADNg con los enzimas Pst-1, HindIII/BamHI.

3.3.4. - Electroforesis de ADN en geles de agarosa

3.3.4.1.- Electroforesis de ADNg

El fraccionamiento del ADNg digerido con los enzimas de restricción Pst-1, Hind-III/BamHI, se llevó a cabo en geles de agarosa (BIO-RAD) al 0'7% en TBE 1x y electroforesis horizontal en cubetas (Maxicell, TDI), empleando como tampón de electroforesis TBE 1x. Cada una de las muestras de ADN (4 μ g) se mezcló con un 10% de tampón de carga 10x. La electroforesis se desarrolló a 30 V, durante toda la noche. Después de la electroforesis los geles se tiñeron con una solución de EtBr (10 mg/ml), a razón de 100 μ l EtBr/1000 ml de agua destilada, durante 15 minutos. Transcurrida la electroforesis, y posterior tinción, las bandas de ADN se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta y se fotografiaron con una película Polaroid 665. El peso molecular de los fragmentos se estimó empleando como marcadores el ADN del fago lambda digerido con HindIII y con BstII respectivamente (New England Biolabs).

3.3.4.2.- Electroforesis de ADNk

Cada una de las muestras de ADNk (1 μ g) se sometió a electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2'2% en TBE 1x, utilizando como tampón de electroforesis TBE 1x según el protocolo descrito anteriormente (3.3.4.1.). Como marcador de peso molecular se utilizó ADN del bacteriófago PM2 digerido con el enzima de restricción Hae III (Boehringer Mannheim).

- Tampón TBE 10x

Tris 0'89 M.....	107'8 g
Ac. Bórico (Merck) 0'89 M.....	55 g
EDTA 0'025 M.....	9'30 g
Agua destilada c.s.p.....	1000 ml

- Tampón de carga 10x

Azul de bromofenol.....	0'25 %
Xilenocianol.....	0'25 %
SDS.....	0'1 %
Ficoll (Tipo 400; Pharmacia) 15% en agua destilada	

3.3.5.- *Transferencia de ADN*3.3.5.1.- *Transferencia de ADN por capilaridad según Southern (1975) ("Southern Blot")*

Después de la electroforesis los geles se sumergieron en HCl 0'25 M durante 10 minutos. Se lavaron brevemente con agua destilada y a continuación se sometieron a un tratamiento de desnaturalización con NaOH 0'5 M/NaCl 1M durante 30 minutos y a una posterior neutralización con Tris-HCl 0'5 M/NaCl 3M pH 7'4 otros 30 minutos.

Los fragmentos separados de ADN_g y ADN_k se transfirieron por capilaridad según Southern (1975) a filtros de nitrocelulosa (Schleicher & Schuell BA85 0'45 μ m), o nylon (Hybon-N, Amersham), tratados previamente como se explica a continuación. Una vez finalizada la transferencia los filtros se secaron a temperatura ambiente y el ADN se fijó al filtro mediante incubación a 80 °C durante 2 h.

Tratamiento de la nitrocelulosa o nylon

Los filtros de nitrocelulosa o nylon, siempre del mismo tamaño que los geles, se dispusieron flotando en agua destilada con unas gotas de SDS 10% y a continuación se sumergieron en esta solución 10 minutos, finalmente se saturaron con 20x SSC (ClNa 1'5 M/Citrato trisódico 0'15 M).

3.3.5.2.- *Transferencia de ADN mediante vacío ("Slot Blot")*

Para la realización de la técnica las muestras de ADNg y ADNk se desnaturalizaron por adición de 200 μ l de NaOH 0'3 M e incubación a 80° C, 10 minutos. Las muestras así tratadas se enfriaron en hielo y se neutralizaron tras la adición de 300 μ l de tampón de neutralización. A continuación las muestras de ADN se transfirieron a los filtros de nitrocelulosa o nylon utilizando un aparato de "Slot blot" (Schleicher & Schuell Manifold II). Los filtros se secaron al aire durante 15 minutos y el ADN se fijó al filtro por incubación de los mismos a 80° C durante 2 h.

Tampón de neutralización

Tris-HCl 1M pH 8.....2'5 ml
HCl 2M.....1'25 ml
20x SSC.....6'25 ml

3.3.6.- *Caracterización mediante sondas de ADNk*

Se ha utilizado la sonda de ADNk k-1/307 (400 pb) de la cepa MHOM/ES/81/BCN-1, LEM-307 (MON-29), específica para el complejo de *L. (L.) infantum* s.l. (Alvar *et al.*, 1989b).

3.3.6.1.- *Obtención de fragmentos de ADNk*

El ADNk de la cepa LEM-307, digerido con HaeIII, se fraccionó en un gel de agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque) al 1% en TAE 1x. Finalizada la electroforesis el gel fue teñido con EtBr y se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta. La banda correspondiente, de 400 pb, se cortó con un bisturí estéril y se depositó en un tubo eppendorf previamente tarado, calculando por diferencia de peso la cantidad de agarosa almacenándose a -20° C hasta su utilización.

- Tampón TAE 50 x

Tris242 g
 Ác. acético glacial.....57'1 ml
 EDTA 0'5 M pH 8100 ml

3.3.6.2.- Marcaje de ADNk con P^{32}

El fragmento de ADN aislado a partir de un gel de agarosa de bajo punto de fusión, se marcó utilizando la técnica de iniciadores al azar (Feinberg y Volgestein, 1983, 1984) empleando los reactivos de Promega "Prime-a-Gene Labeling System". Una cantidad de ADN en agarosa correspondiente a 25 ng, se desnaturalizó en un volumen máximo de 30 μ l a 100°C durante 7 minutos y a continuación se depositó en hielo. La reacción se inició añadiendo los reactivos en el siguiente orden: tampón de marcaje 5x (10 μ l), mezcla de dNTPs (dATP, dGTP y dTTP, excepto dCTP) (2 μ l), ADN que vamos a marcar (25 ng en un volumen máximo de 30 μ l), BSA (10 mg/ml)(2 μ l), 5 μ l de Ó- P^{32} dCTP (3.000 Ci/mmol) y 2 μ l (5 U) del enzima Klenow. La reacción se desarrolló a temperatura ambiente durante toda la noche. El P^{32} no incorporado se eliminó pasando el producto de reacción a través de una columna de Sephadex-G50. La actividad específica de la sonda fue alrededor de 10⁹ cpm.

3.3.6.3.- Hibridación con sondas de ADNk

Los filtros de nitrocelulosa o nylon con el ADNk fijado se incubaron a 42°C durante 1 h, en 10 ml de solución de prehibridación. Después se añadió a la solución la sonda radiactiva (10⁶ cpm/ml), previamente desnaturalizada (100°C, 5 min.), y se dejaron hibridando a 42°C durante toda la noche.

Finalizada la hibridación los filtros se lavaron cuatro veces, durante 15 minutos cada uno, en baño a 65°C, con una solución de 2x SSC+ 0'1 % SDS (dodecilsulfato sódico, Bio-Rad). A continuación los filtros se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a autorradiografía utilizando una película AGFA-RP2 50 AFW, manteniéndolos a -70°C durante tiempos variables.

Solución de prehibridación

- Solución de Denhardt 50x.....10 ml
 - Formamida 100% (Merck).....50 ml
 - EDTA 0'5 M pH 8.....1 ml
 - 20x SSC.....25 ml
 - ADN de Timo de ternera (Sigma).....5 mg
 - SDS 10%.....2 ml
 - Agua destilada estéril c.s.p.....100 ml
- Conservar a 4° C.

Solución de Denhardt 50x

- Ficoll (Sigma).....5 g
- Polivinilpirrolidona (Sigma)5 g
- BSA (Sigma)5 g
- Agua destilada estéril c.s.p.....500 ml

Filtrar a través de una membrana de 0'22 μ m. Hacer alícuotas de 25 ml y almacenar a -20° C.

3.3.7.- Caracterización mediante sondas de ADNg

Se han utilizado tres sondas de ADNg homólogas: 7-059, pDK20 y pDK10, cedidas por el Dr. G.J.J.M. Van Eys (Royal Tropical Institute, Amsterdam, Holanda) y cuyas características se describen a continuación.

- 7-059 (Van Eys *et al.*, 1989): clon seleccionado a partir de una librería de ADN total de *L. (L.) infantum* (ITMAP263). Se trata de un clon recombinante en pUC19 que contiene en el sitio EcoR1 el fragmento de 5.0 Kb.
- pDK20 (Van Eys *et al.*, 1991): clon seleccionado a partir de una librería genómica de *L. (L.) major* (MHOM/SN/00/DK1). Se trata de un clon recombinante en pUC18, que contiene en el sitio Pst1 dos fragmentos de 1.8 y 2.0 Kb respectivamente.

- pDK10 (Guizani *et al.*, 1994): clon seleccionado a partir de una librería genómica de *L. (L.) major* (MHOM/SN/00/DK1). Se trata de un clon recombinante en pUC18, que contiene en el sitio PstI un fragmento de 1.8 Kb.

3.3.7.1.- Purificación de fragmentos de ADN clonados

Las bacterias transformadas con los plásmidos descritos anteriormente se cultivaron en medio líquido Luria-Bertani (2LB) con ampicilina (70 µg/ml). El ADN correspondiente se obtuvo a partir de 3 ml de cultivo, utilizando los reactivos para purificación de ADN "Magic Minipreps" (Promega). La obtención del fragmento clonado se realizó mediante digestión con los enzimas de restricción correspondientes. Posteriormente el material digerido se fraccionó en geles de agarosa de bajo punto de fusión (Sea Plaque FMC, Bioproducts Corporation) al 1% en TAE 1x. La banda correspondiente al fragmento recombinante se hizo visible sobre un transiluminador de luz ultravioleta y se cortó con un bisturí, depositándose en un eppendorf previamente tarado, calculando por diferencia de peso la cantidad de agarosa.

Medio 2 LB líquido (Luria-Bertani)

- Bacto-triptona (Difco).....20 g
- Extracto de levadura (Difco).....10 g
- NaCl (Merck).....20 g
- Bacto-dextrosa (Difco).....1 g
- Agua destilada estéril.....960 ml

Ajustar el pH a 7 con NaOH 5N. El medio 2LB sólido se preparó añadiendo 20 g de agar al correspondiente medio líquido.

3.3.7.2.- Marcaje de los fragmentos de ADN recombinante con P^{32}

Los fragmentos de ADN recombinante se marcaron siguiendo la técnica de los iniciadores al azar (Random Primer Radiolabelling) como se explica en el punto 3.3.6.2.

3.3.7.3.- Hibridación con sondas de ADNg

Los filtros de nitrocelulosa o nylon con el ADNg fijado se incubaron en 10 ml de solución de prehibridación durante 3 h a 65°C. Transcurrido este tiempo se añadió a la solución la sonda radiactiva desnaturalizada (100°, 5 minutos) y los filtros se dejaron hibridar durante toda la noche a 65°C. Terminada la hibridación los filtros se lavaron a 65°C, durante 30 minutos, una vez con 3x SSC+ 0'1 % SDS y dos veces con 0'1x SSC + 0'1% SDS. A continuación los filtros se secaron a temperatura ambiente y se sometieron a autorradiografía utilizando una película AGFA-RP2 50 AFW manteniéndolos a -70°C durante tiempos variables.

Solución de prehibridación

- SDS (Bio-Rad).....7 g
- BSA (Sigma).....1 g
- EDTA 2 mM.....400 µl
- Tampón fosfato 5M pH 7.....10 ml
- ADN de esperma de salmón.....10 ml
(10 mg/ml)(Sigma)
- Agua destilada estéril c.s.p.....100 ml

3.4.- Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD)

3.4.1.- Extracción de ADN

El ADN_g se extrajo según el protocolo descrito en el punto 3.3.1., separándose del ADN_k mediante gradiente de densidad en CsCl/EtBr según se describe en el apartado 3.3.1.1. y se cuantificó según se explica en el punto 3.3.2..

3.4.2.- Amplificación

Las condiciones de amplificación utilizadas fueron análogas a las descritas por Williams *et al.* (1990, 1993) y se llevaron a cabo en el Laboratorio de "Génétique Moléculaire des Parasites et des Insectes Vecteurs" del Centro de Investigación ORSTOM (Montpellier) que dirige el Dr. Michel Tibayrenc.

Se utilizaron siete iniciadores suministrados por, Operon Technologies, ensayados previamente (Tibayrenc *et al.*, 1993) cada uno constituido por 10 nucleótidos y sin ninguna secuencia palindrómica,

A1.- CAGGCCCTTC	A2.- TGCCGAGCTG	A5.- AGGGGTCTTG
A7.- GAAACGGGTG	A10.- GTGATCGCAG	A12.- TCGGCGATAG
A15.- TTCCGAACCC		

La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 100 μ l:

- 1.- 10 μ l de tampón específico para la Taq polimerasa (Tris-HCl 100 mM pH 8'3; MgCl₂ 6H₂O 15 mM; KCl 500 mM; gelatina 1mg/ml)(Boehringer)
- 2.- 2 μ l de cada dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (5 mM) (Boehringer)
- 3.- 2 μ l de iniciador (10 μ M)
- 4.- 2 μ l de ADN (10 ng/ μ l) = 20 ng
- 5.- 0'3 μ l de Taq polimerasa (1'5 UI) (Boehringer)
- 6.- Agua destilada estéril c.s.p. 100 μ l

Las amplificaciones se realizaron en un termociclador automático (PTC-100, M.J. Research, Inc.), con un programa de amplificación de 45 ciclos (desnaturalización 1 min.

a 94°C, apareamiento 1 min. a 36°C y síntesis 2 min. a 72° C), y un ciclo final de extensión de 7 min. a 72°C.

3.4.3.- Electroforesis

Los fragmentos de ADN amplificados se separaron mediante electroforesis horizontal (120 v, 5 h) en geles de agarosa (Bio-Rad) al 1'6% en TAE con 0'5 µl/ml de BrEt, empleando como tampón de electroforesis TAE 1X con 0'5 µl/ml de BrEt. Cada uno de los ADNs amplificados (25 µl) se mezcló con un 10% de azul de bromofenol. Finalizada la electroforesis los geles se visualizaron en un transiluminador ultravioleta y se fotografiaron con una película Polaroid 665. El peso molecular de los fragmentos se estableció empleando como marcador de peso molecular el ADN del fago SPP1 digerido con EcoRI (Boehringer). En algunos casos se utilizaron como marcadores el ADN del fago lambda digerido con Hind III y con BstE respectivamente (New England Biolabs).

3.4.4.- Interpretación de los resultados

Cada una de las bandas son numeradas, comenzando por 1 para la de mayor peso molecular. Para cada iniciador, cada aislado y cepa de referencia estará pues representado por un conjunto de números y estará caracterizado por un conjunto de perfiles correspondiente a los diferentes iniciadores utilizados. Todos los aislados idénticos para los siete iniciadores se sitúan en el mismo "rapdema" (término denominado así por analogía con "zimodema"). Los grados de similitud genética entre dos "rapdemas" dados se estiman en función del porcentaje de bandas en común que presentan.

Desde el punto de vista estadístico, los genotipos revelados para un iniciador dado, son tratados como "genotipos unilocus" y el conjunto de genotipos revelados para los siete iniciadores "genotipo multilocus". Este tratamiento estadístico es lícito para las pruebas utilizadas de desequilibrio de ligazón, ya que la probabilidad de que dos primers diferentes amplifiquen los mismos loci es despreciable.

3.5. Análisis de los datos

3.5.1.- Determinación de las distancias genéticas

El grado de disimilaridad entre dos zimodemas o rapdemas se calculó utilizando el programa de ordenador TAXONOMIE (Serres y Roux, 1986) mediante el índice de distancia de Jaccard D(J) (Jaccard, 1908) definido por la fórmula:

$$D_J = 1 - (C/2N - C)$$

C: número de bandas comunes a dos zimodemas o rapdemas (genotipos multilocus) considerados

N: número total de bandas entre los dos zimodemas o rapdemas (genotipos multilocus) comparados

Los datos obtenidos en el estudio del polimorfismo enzimático en el caso de la caracterización de los aislados PAULO y ANA fueron analizados utilizando el programa de taxonomía numérica TAXAN (Information Resources Group, Maryland Biotechnology Institute, University Maryland, College Park, MD 20742-USA), aplicando el coeficiente de similaridad de Jaccard S(J). Se puede pasar fácilmente del índice de similaridad al índice de distancia de Jaccard D(J) (Jaccard, 1908) mediante la fórmula:

$$D = S_{\max} - S$$

S_{\max} = valor máximo del índice de similitud

La matriz de similaridad y distancias generadas respectivamente es utilizada por el programa para realizar el análisis de agrupamiento y finalmente diseñar un dendograma con la distribución de los datos.

3.5.2.- *Análisis de genética de poblaciones*

Las dos consecuencias fundamentales de intercambio genético son: la segregación de alelos en un locus dado y la recombinación de genotipos de un locus a otro. Demostrar que estos dos procesos son raros o están ausentes, equivale a demostrar que la reproducción sexual es rara o ausente.

Hay diferentes pruebas que son utilizados como argumentos indirectos en favor de una reproducción clonal (Tibayrenc *et al.*, 1990; Tibayrenc *et al.*, 1991; Tibayrenc y Ayala, 1991; Tibayrenc y Abderrazak, 1993). Algunas de ellas pueden ser interpretados cualitativamente, mientras que otras, son objeto de estimaciones estadísticas. Cada uno de ellas aporta una información específica, pudiendo ser alguno de ellas significativas y otras no significativas. El hecho de que una de las pruebas sea significativa es suficiente para poner en evidencia una desviación de la panmixia (población panmíctica es aquella en la que los intercambios genético se realizan al azar).

La hipótesis nula, por tanto, en todas las pruebas utilizados para poner en evidencia una clonalidad es una estructura panmíctica. Este análisis han sido aplicado tanto a los resultados de la caracterización enzimática como a la caracterización mediante RAPD.

3.5.2.1.- *Pruebas de segregación*

Bajo la hipótesis panmíctica, la ley de Hardy-Weinberg permite calcular, a partir de las frecuencias alélicas observadas, las frecuencias genotípicas teóricas en cada locus. El que las frecuencias observadas sean estadísticamente diferentes a las esperadas es un argumento suficiente para decir que los flujos genéticos en esta población están inhibidos.

Para llevar a cabo estos tests es necesario que se cumplan una serie de requisitos: a) los alelos de cada genotipo deben ser identificables, b) la ploidia del organismo debe ser conocida y c) el organismo no debe ser haploide, por lo que en nuestro caso no ha sido posible llevarlos a cabo.

3.5.2.2.- *Pruebas de recombinación*

En el caso de una población panmíctica (libre recombinación), la frecuencia teórica de un genotipo multilocus dado es el producto de las probabilidades observadas de los

genotipos unilocus. A continuación se explican las pruebas de recombinación específicos o complementarios propuestos por Tibayrenc *et al.*, 1990 y Tibayrenc y Ayala (1991).

d1: es la probabilidad combinatoria de obtener en una población panmíctica, por simple azar, un genotipo dado con un efectivo igual o superior al que es efectivamente observado en la muestra estudiada, y viene dado por la siguiente fórmula:

$$P = \sum_{i=m}^n \frac{n! \cdot x^i \cdot (1-x)^{n-i}}{i! \cdot (n-i)!}$$

n: número total de individuos

m: número de individuos que poseen el genotipo multilocus considerado

x: frecuencia teórica de ese genotipo (producto de las frecuencias observadas de los genotipos unilocus que lo componen)

Esta prueba está basada en el hecho de que en caso de reproducción clonal, los genotipos se reproducen sin cambios de una generación a otra, como fotocopias. Algunos de ellos estarán representados en exceso en relación a las previsiones panmícticas.

Los mismos resultados pueden obtenerse por una simple X^2 , pero en la mayoría de los casos el efectivo teórico es muy pequeño, por lo que no es posible aplicarla.

d2: probabilidad de observar, no importa cual genotipo multilocus en un número igual o superior al del genotipo multilocus más representado en la muestra.

e: probabilidad de observar un número de genotipos multilocus diferentes igual o inferior al que es observado en la muestra. En el caso de reproducción asexual, se espera que el número de genotipos estén disminuidos.

f: probabilidad de observar un nivel estadístico de desequilibrio de ligazón igual o superior al que es efectivamente observado en la muestra.

Las pruebas *d2*, *e* y *f* están basados en las simulaciones de Montecarlo con 10^4 interacciones para cada una.

Este análisis, no es prueba directa de propagación clonal, pero si indicativos de una

desviación a la panmixia. Existen otros factores que influyen en el flujo genético, como obstáculos físicos, selección natural y especiación biológica críptica.

RESULTADOS

4.- RESULTADOS

4.1.- Caracterización enzimática

Se han caracterizado un total de 84 aislados de *Leishmania*, 31 caninos y 53 humanos. Las características de cada uno de ellos, código y origen aparecen en las Tablas 9, 10 y 11 correspondientes al apartado 3.1.1. de Material y Métodos. La caracterización enzimática se llevó a cabo según se explica en los diferentes puntos del apartado 3.2. de Material y Métodos, mediante electroforesis horizontal en geles gruesos de almidón, 14 sistemas enzimáticos y 16 loci.

La caracterización del aislado denominado por nosotros Paulo (MHOM/AO/91/LLM-85) dado su origen geográfico ha sido tratado en un capítulo aparte. Las características especiales que inicialmente presentó el aislado denominado ANA (MHOM/ES/91/LLM-325) hicieron que su caracterización se tratara también en un capítulo específico.

4.1.1.- Caracterización enzimática de los aislados caninos

Dentro de este grupo se han caracterizado un total de 31 aislados, 28 aislados viscerales y 3 cutáneos de perros que también presentaban lesiones viscerales, de diferente origen geográfico.

En la Tabla 17 se recogen los perfiles enzimáticos correspondientes a las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* presentes en España y los 31 aislados caninos separados en función del tipo de leishmaniosis (LV o LC) y del tipo de muestra biológica de la que proceden. Todos los aislados resultaron ser zimodema 1 (MAD-1).

En las Figuras 3 y 4 se muestran los electromorfos obtenidos para las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* y algunos aislados caninos con los sistemas enzimáticos G6P, 6PG, MDH, GPI y PGM.

En la Tabla 18 se resumen las características, origen y zimodema de cada uno de los aislados caninos estudiados.

Tabla 17.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania caninos.

CEPAS DE REFERENCIA	ENZIMAS ESTUDIADOS																
	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
A) LV																	
- MÉDULA																	
BOXER	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
PASTOR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
CAZA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
DOCIL	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
CHATA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
OREJAS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
POINTER	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
DOBERMAN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
BELGA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
PERDIGUERO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
- MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA																	
TARCRIS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
TIMIDO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
37-B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
30-B	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1

Tabla 17.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania caninos (continuación).

ENZIMAS ESTUDIADOS																	
CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
A) LV																	
- GANGLIO POPLITEO																	
BLANCO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
CANTO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
OSO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
DORA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
37-G	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
ALGETE	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
TARZAN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
YOCKI	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
WISKA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
BETTY	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
TUC	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
- XENODIAGNOSTICO																	
OREJAS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
BELGA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
PERDIGUERO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1

Tabla 17.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania caninos (continuación).

ENZIMAS ESTUDIADOS																	
CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
B) LC																	
- PIEL																	
CURRO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
37-P	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
30-P	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1

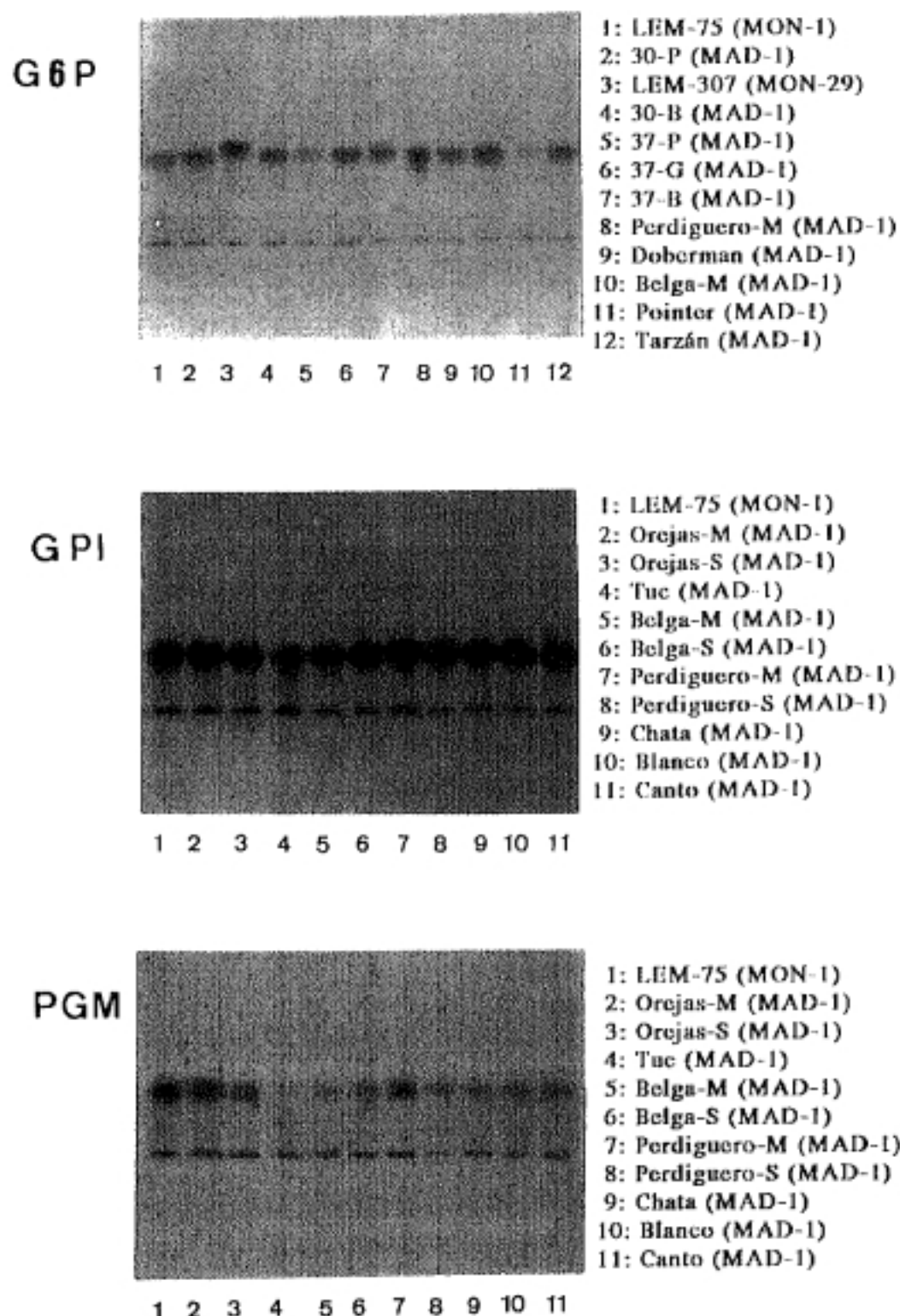


Figura 3.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos G6P, GPI y PGM. P: piel, B: monocitos de sangre periférica, G: ganglio poplíteo, M: médula ósea, S: xenodiagnóstico directo.

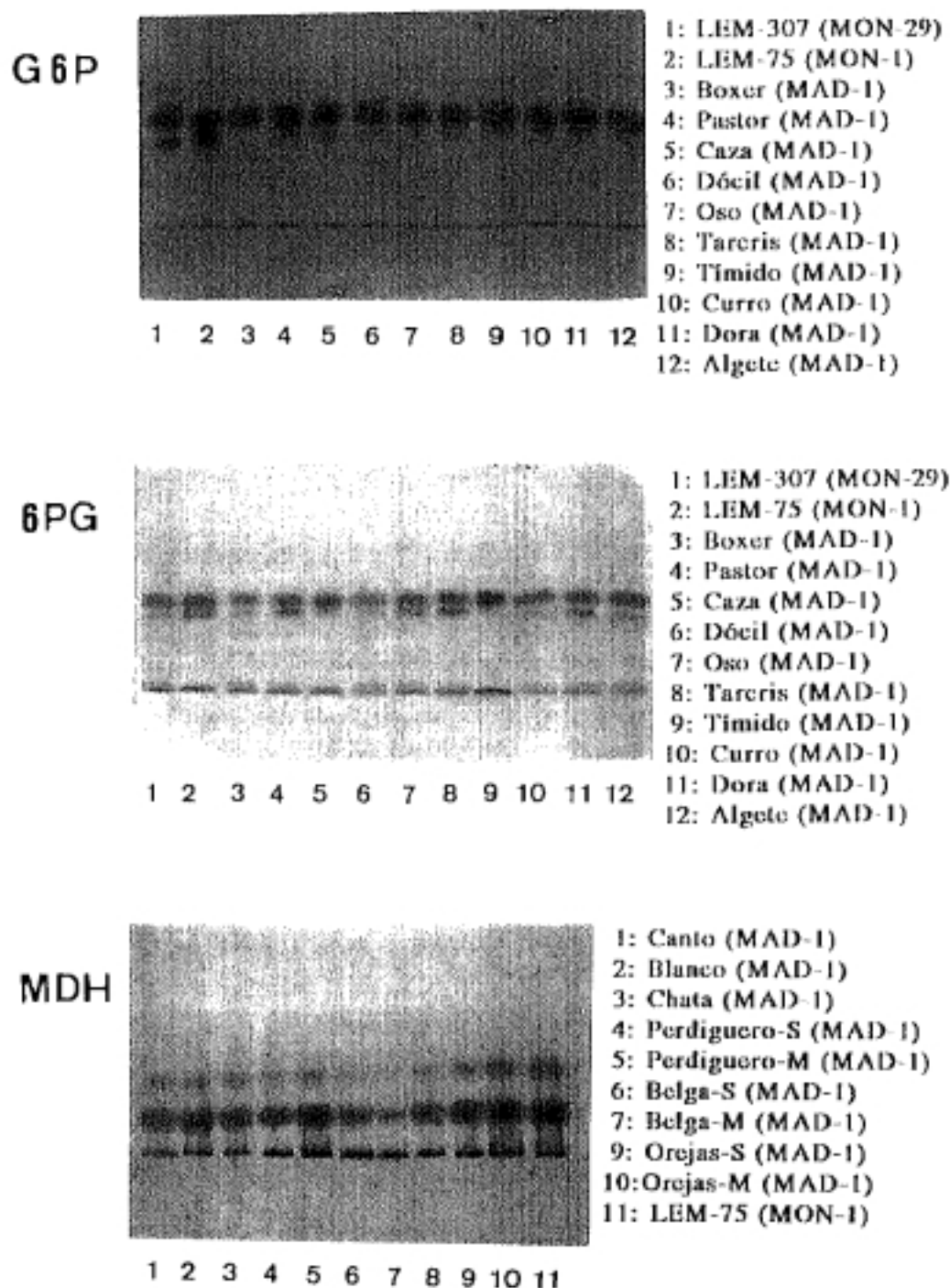


Figura 4.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos G6P, 6PG y MDH. M: médula ósea, S: xenodiagnóstico directo.

TABLA 18.- Características de los aislados caninos.

AISLADOS	CODIGO	ORIGEN	ZM
A) LV			
- Médula			
Boxer*	MCAN/ES/92/LLM-360	Madrid	1
Pastor	MCAN/ES/92/LLM-369	Madrid	1
Caza	MCAN/ES/92/LLM-374	Aranjuez (Madrid)	1
Dócil*	MCAN/ES/92/LLM-375	Aranjuez (Madrid)	1
Chata*	MCAN/ES/92/LLM-368	Cantoblanco (Madrid)	1
Orejas	MCAN/ES/92/LLM-367	Valdepeñas (C. Real)	1
Pointer	MCAN/ES/92/LLM-358	Zaragoza	1
Doberman	MCAN/ES/92/LLM-359	Zaragoza	1
Belga	MCAN/ES/92/LLM-363	Zaragoza	1
Perdiguero	MCAN/ES/92/LLM-365	Zaragoza	1
- Ganglio poplíteo			
Blanco	MCAN/ES/91/LLM-342	Torreldones (Madrid)	1
Canto	MCAN/ES/91/LLM-343	Manzanares (Madrid)	1
Oso	MCAN/ES/91/LLM-344	Colmenarejo (Madrid)	1
Dora	MCAN/ES/91/LLM-345	Algete (Madrid)	1
37-G	MCAN/ES/92/LLM-348	Cantoblanco (Madrid)	1
Algete	MCAN/ES/91/LLM-84	Algete (Madrid)	1
Tarzán	MCAN/ES/87/LLM-32	Mallorca	1
Yocki	MCAN/ES/83/LLM-16	Madrid	1
Wiska	MCAN/ES/83/LLM-20	Alcalá de Henares (Madrid)	1
Betty	MCAN/ES/85/LLM-17	Madrid	1
Tuc	MCAN/ES/83/LLM-298	Mallorca	1
- Monocitos de sangre periférica			
Tarcis	MCAN/ES/93/LLM-393	Aranjuez (Madrid)	1
Tímido*	MCAN/ES/92/LLM-361	Cantoblanco (Madrid)	1
37-B	MCAN/ES/92/LLM-347	Cantoblanco (Madrid)	1
30-B	MCAN/ES/91/LLM-350	Cantoblanco (Madrid)	1
- Xenodiagnóstico			
Orejas	MCAN/ES/92/LLM-367	Valdepeñas (C. Real)	1
Belga	MCAN/ES/92/LLM-363	Zaragoza	1
Perdiguero	MCAN/ES/92/LLM-365	Zaragoza	1
B) LC			
- Piel			
Curro	MCAN/ES/92/LLM-376	Aranjuez (Madrid)	1
37-P	MCAN/ES/92/LLM-346	Cantoblanco	1
30-P	MCAN/ES/91/LLM-349	Cantoblanco	1

* Asintomáticos

4.1.2.- Caracterización enzimática de los aislados humanos

4.1.2.1.- Variabilidad

Se han caracterizado un total de 52 aislados de *Leishmania*, 44 de sujetos VIH+ (41 LV y 3 LC), 7 de sujetos inmunocompetentes (4 LV y 3 LC) y un aislado de un transplantado renal con LV. En todos los casos, los valores de cada uno de los electromorfos se obtuvieron a partir de la medida de la distancia de migración desde el punto en el que se aplicó la muestra hasta el centro de la banda, en relación a la obtenida para la cepa de referencia MHOM/FR/78/LLM-75, según la fórmula del apartado 3.2.6. de Material y Métodos. De los 16 loci estudiados, sólo 4 resultaron polimórficos: MDH, G6P, NP1 y GPI.

En la Tabla 19 se muestran los perfiles enzimáticos de las cepas de referencia correspondientes a diferentes zimodemas de *L. (L.) infantum*, así como de los aislados de *Leishmania* de sujetos VIH+, separados en función del tipo de leishmaniosis (LV o LC) y del tipo de muestra biológica de la que proceden. Dentro del grupo de aislados caracterizados de sujetos VIH+ se han encontrado 8 zimodemas: MAD-1, MAD-24, MAD-28, MAD-29, MAD-33, MAD-34, MAD-183, MAD-501.

Grupo A (LV y VIH+): En los 41 aislados incluidos en este grupo, el zimodema 1 (MAD-1, MON-1) estuvo representado 18 veces (en 15 aislados de Madrid y 3 de Mallorca); siete aislados fueron zimodema 24 (MAD-24) todos ellos de Madrid; seis aislados de Madrid pertenecieron al zimodema 33 (MAD-33); otros tres aislados, de la provincia de Alicante, Madrid y Mallorca respectivamente, fueron zimodema 29 (MAD-29); y otro aislado, de la provincia de Alicante, fué zimodema 28 (MAD-28). Hay que destacar que el zimodema 24 es la primera vez que se describe en España en sujetos VIH+. Así mismo, el zimodema 34 (MAD-34), representado en un sujeto VIH+ de Mallorca, es la primera vez que se describe en la asociación LV y VIH+ en la cuenca Mediterránea.

Los aislados Garrido, Cuadros y Lara, de las provincias de Jaén, Madrid y Córdoba respectivamente, presentaron la misma variante enzimática que el ZM-34 (MAD-34) (MDH₁₀₄) y además un electromorfo con valor para la GPI₁₁₅, perteneciendo por tanto a un nuevo zimodema ZM-183 (MAD-183) descrito recientemente en dos sujetos VIH+ (Pratlong *et al.*, 1993). Los aislados Vélez y Daniel, ambos de la provincia de Madrid, reunieron las mismas características enzimáticas que las de un zimodema 29, pero además

presentaron un electromorfo con valor para la GPI₁₀₅, siendo un zimodema nuevo, que no ha sido descrito previamente, y que nosotros hemos denominado MAD-501 (ver Figura) (Jiménez *et al.*, en prensa).

Grupo B (LC y VIH+): Los tres aislados cutáneos dentro de este grupo, todos de Madrid, pertenecieron a los zimodemas MAD-1, MAD-33 y MAD-183.

En la Tabla 20 aparecen los perfiles enzimáticos de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum*, así como de cada uno de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunocompetentes (LV y LC), grupo D y E respectivamente, y un aislado de un caso de LV en un transplantado renal (grupo C).

Grupo C (LV y otro tipo de inmunosupresión): El único aislado dentro de este grupo presentó el mismo perfil enzimático de un zimodema 1 (MAD-1).

Dentro del grupo de aislados de sujetos inmunocompetentes (7 aislados) se han encontrado 3 zimodemas: MAD-1, MAD-24 y MAD-34.

Grupo D (LV): En este grupo, dos de los aislados de médula fueron zimodema 1 (MAD-1) y el tercero MAD-34. El aislado obtenido mediante xenodiagnóstico fue un zimodema 24 (MAD-24).

Grupo E (LC): Dentro de este grupo de aislados, todos de Madrid, dos aislados resultaron ser zimodema 34 (MAD-34) y el tercero, zimodema 24 (MAD-24).

En las Figuras 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 y 12 se muestran electromorfos obtenidos para las cepas de referencia y algunos aislados con cada uno de los sistemas enzimáticos utilizados.

En las Tablas 21 y 22 se resumen las características, origen y zimodema de los aislados caracterizados.

En la Tabla 23 aparece el número de zimodemas que se han encontrado dentro de cada uno de los grupos. La distribución geográfica de cada uno de los zimodemas encontrados queda recogida en la Figura 13.

Tabla 19.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum y aislados de Leishmania de sujetos VIH+.

CEPAS DE REFERENCIA	ENZIMAS ESTUDIADOS																
	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
A) LV y HIV+																	
- MEDULA																	
ANTONIO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
DANIEL	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	105	100	100	501
58140	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
59933	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
MILAGROS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
JESUS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
5825	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
ESPIN	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
GARRIDO	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	115	100	100	183
TEJUCAR	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
CARRASCO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
ANASTASIO	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
ANTUNEZ	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
PALMA	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
CUADROS	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	115	100	100	183
JUSTO	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
CLEMENTE	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24

Tabla 19.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania de sujetos VIH+ (continuación).

ENZIMAS ESTUDIADOS																	
CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
A) LV y HIV+																	
- MEDULA																	
NATALIO	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
MASSA-1	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	34
RIBAS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
ESTESO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
ANGEL	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
ARMENTERO	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
ARROYO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
CEJAS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
ENRIQUE	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
FRANCISCO	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
TOMAS	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
MORENO	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
LARA	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	115	100	100	183
BERGER	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEONOR	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
VELEZ	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	105	100	100	501

Tabla 19.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania de sujetos VIH+ (continuación).

CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	ENZIMAS ESTUDIADOS										ZM
								NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2		
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29	
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28	
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80	
A) LV y VIH+																		
- MONOCITOS DE SANGRE PERIFERICA																		
ROJAS	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24	
MANU	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
MORA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
PUMA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
- PUNCION ESPLENICA																		
ARCE	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28	
- SANGRE TOTAL																		
LOVA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
- XENODIAGNOSTICO																		
SANTO	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	
JIRO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
B) LC y VIH+																		
- BIOPSIA DE PIEL																		
OSCAR	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33	
EGIDO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1	
NAVARRO	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	115	100	100	183	

Tabla 20.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de L.(L.) infantum así como para cada uno de los aislados de Leishmania de sujetos inmunocompetentes e inmunosuprimidos.

ENZIMAS ESTUDIADOS																	
CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD1	SOD2	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	29
BCN-65	104	100	100	100	102	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	28
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
LEM-425	104	100	100	100	100	100	100	130	100	100	100	100	100	100	100	100	80
AISLADOS																	
C) LV Y OTRO TIPO DE INMUNOSUPRESION																	
- MEDULA																	
ELENA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
D) LV																	
- MEDULA																	
SEGUI	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	34
KALAY	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
AZAÑEDO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
- XENODIAGNOSTICO																	
LANG	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24
E) LC																	
- BIOPSIA DE PIEL																	
JAVIER	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	34
ZAMORA	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	34
ARENAS	104	100	100	100	100	100	100	140	100	100	100	100	100	100	100	100	24

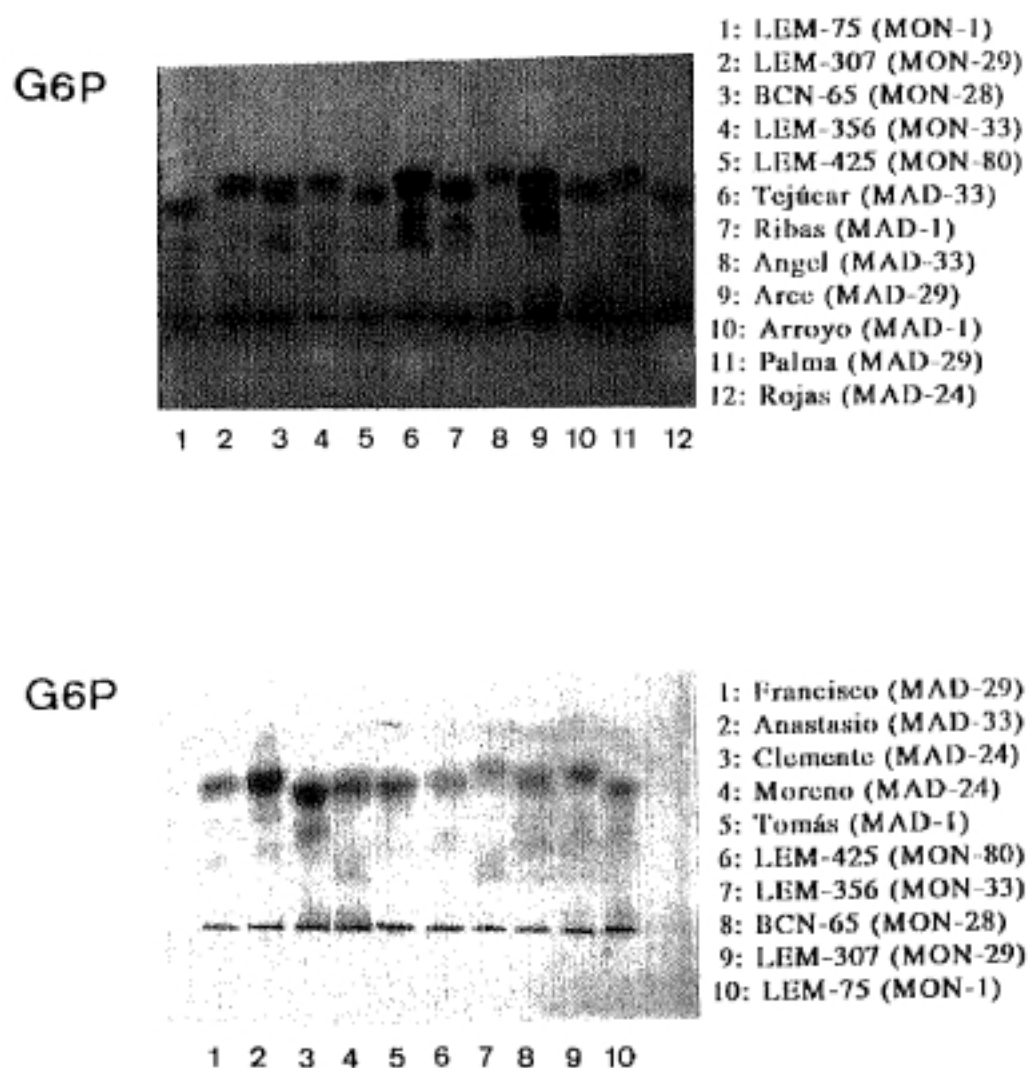


Figura 5.- Electromorfos obtenidos para el sistema enzimático G6P.

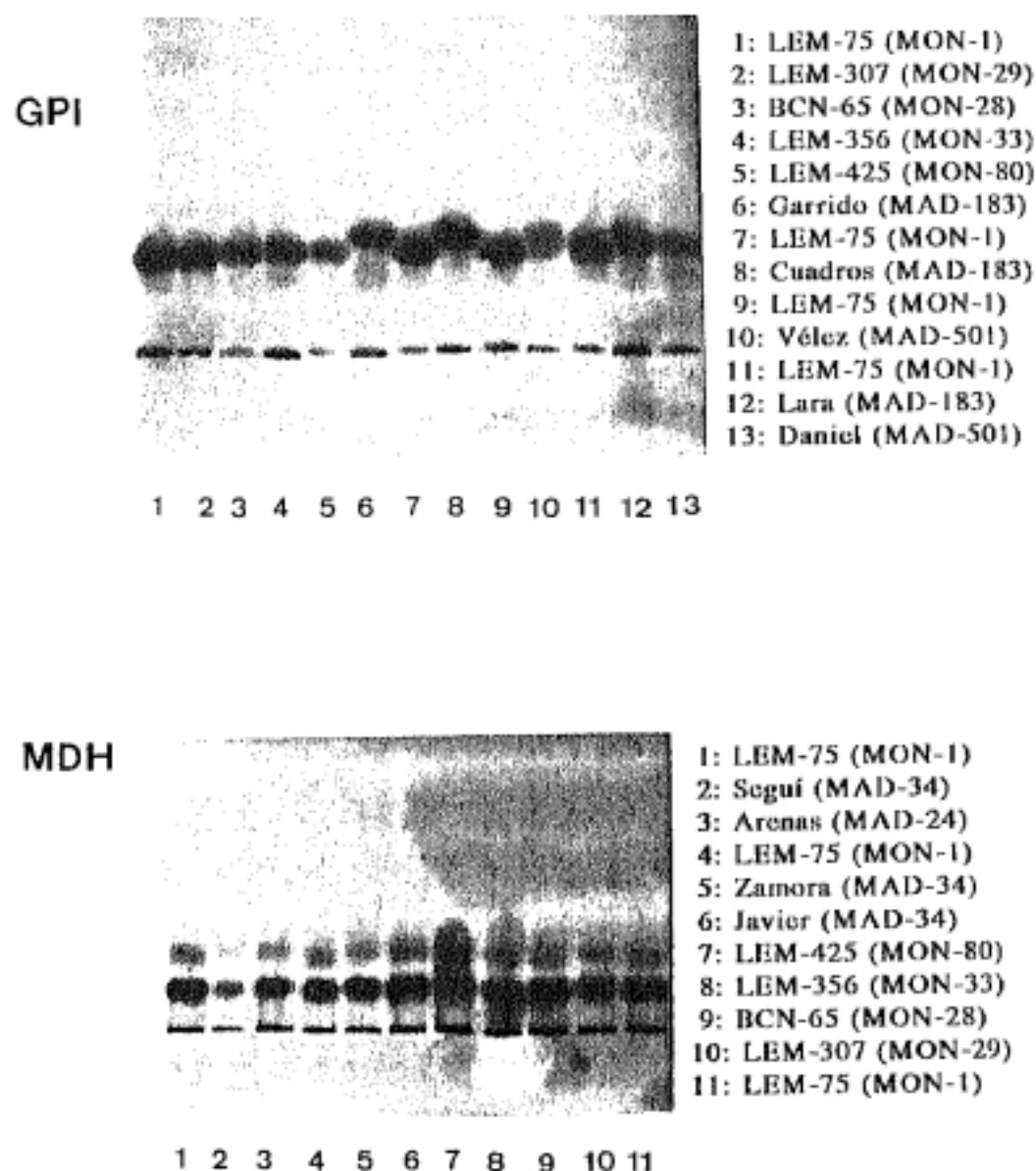


Figura 6 .- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos GPI y MDH.

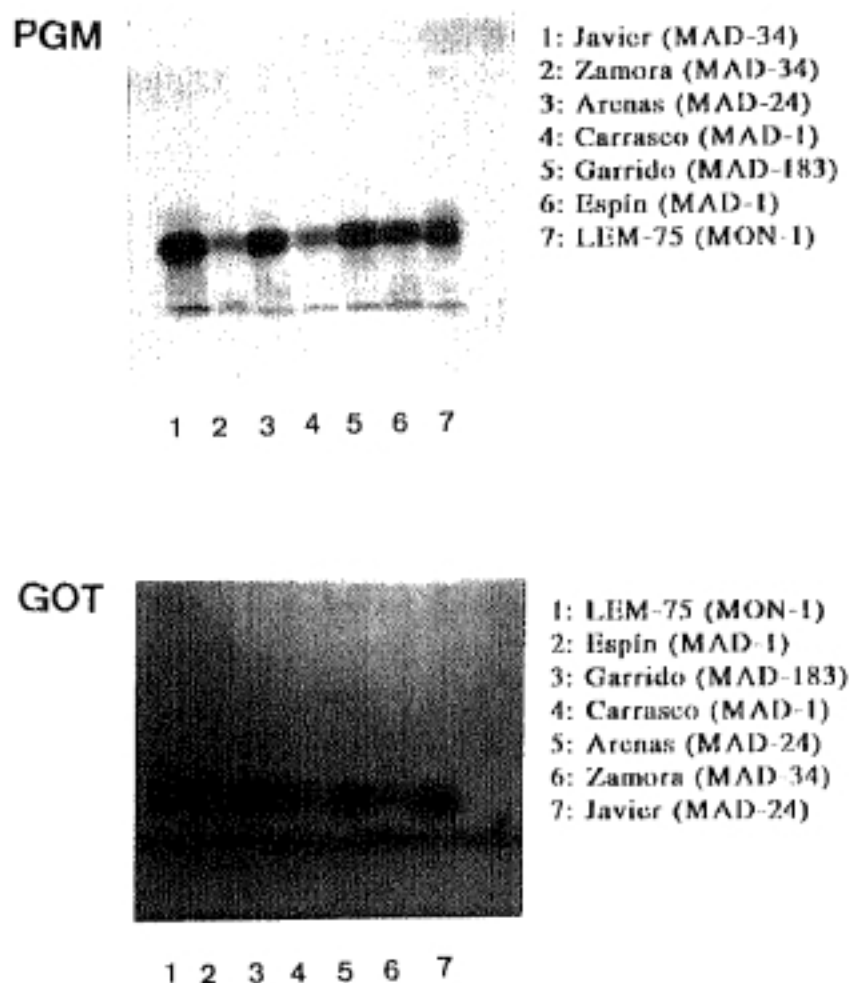


Figura 7.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos PGM y GOT.

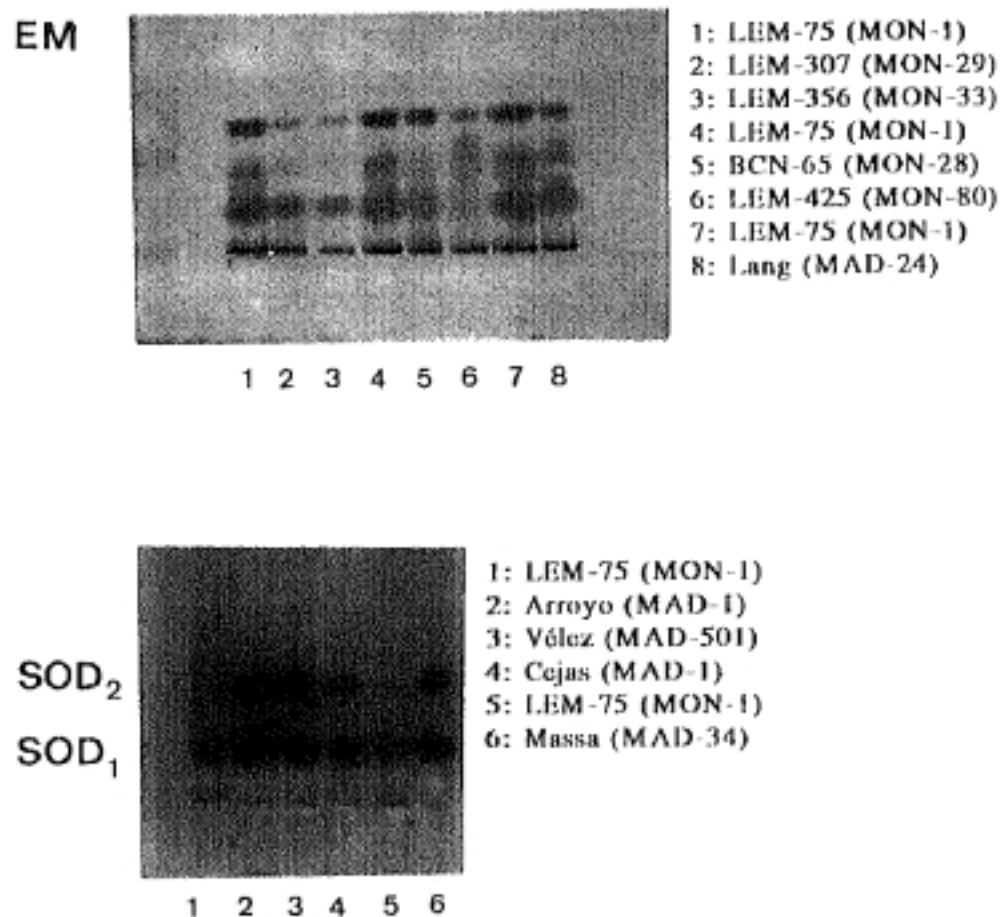
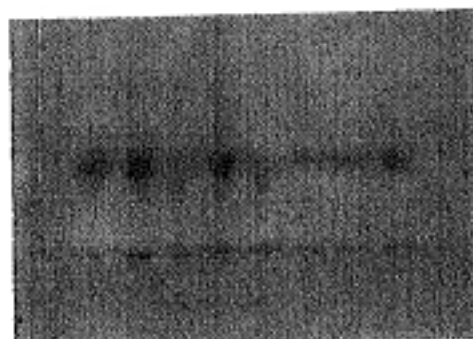


Figura 8.- Electromorfos obtenidos con los sistemas enzimáticos EM y SOD.

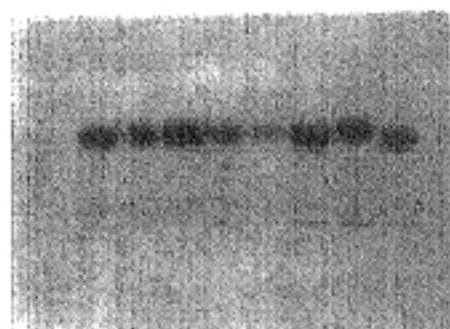
GLUD



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: Lang (MAD-24)
- 2: LEM-75 (MON-1)
- 3: LEM-425 (MON-80)
- 4: LEM-75 (MON-1)
- 5: LEM-356 (MON-33)
- 6: BCN-65 (MON-28)
- 7: LEM-307 (MON-29)
- 8: LEM-75 (MON-1)

GPI



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: BCN-65 (MON-28)
- 3: LEM-307 (MON-29)
- 4: LEM-356 (MON-33)
- 5: LEM-425 (MON-80)
- 6: Egido (MAD-1)
- 7: Navarro (MAD-183)
- 8: Kalay (MAD-1)

G6P



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: BCN-65 (MON-28)
- 3: LEM-307 (MON-29)
- 4: LEM-356 (MON-33)
- 5: LEM-425 (MON-80)
- 6: Egido (MAD-1)
- 7: Navarro (MAD-183)
- 8: Kalay (MAD-1)

Figura 9.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos GLUD, GPI y G6P.

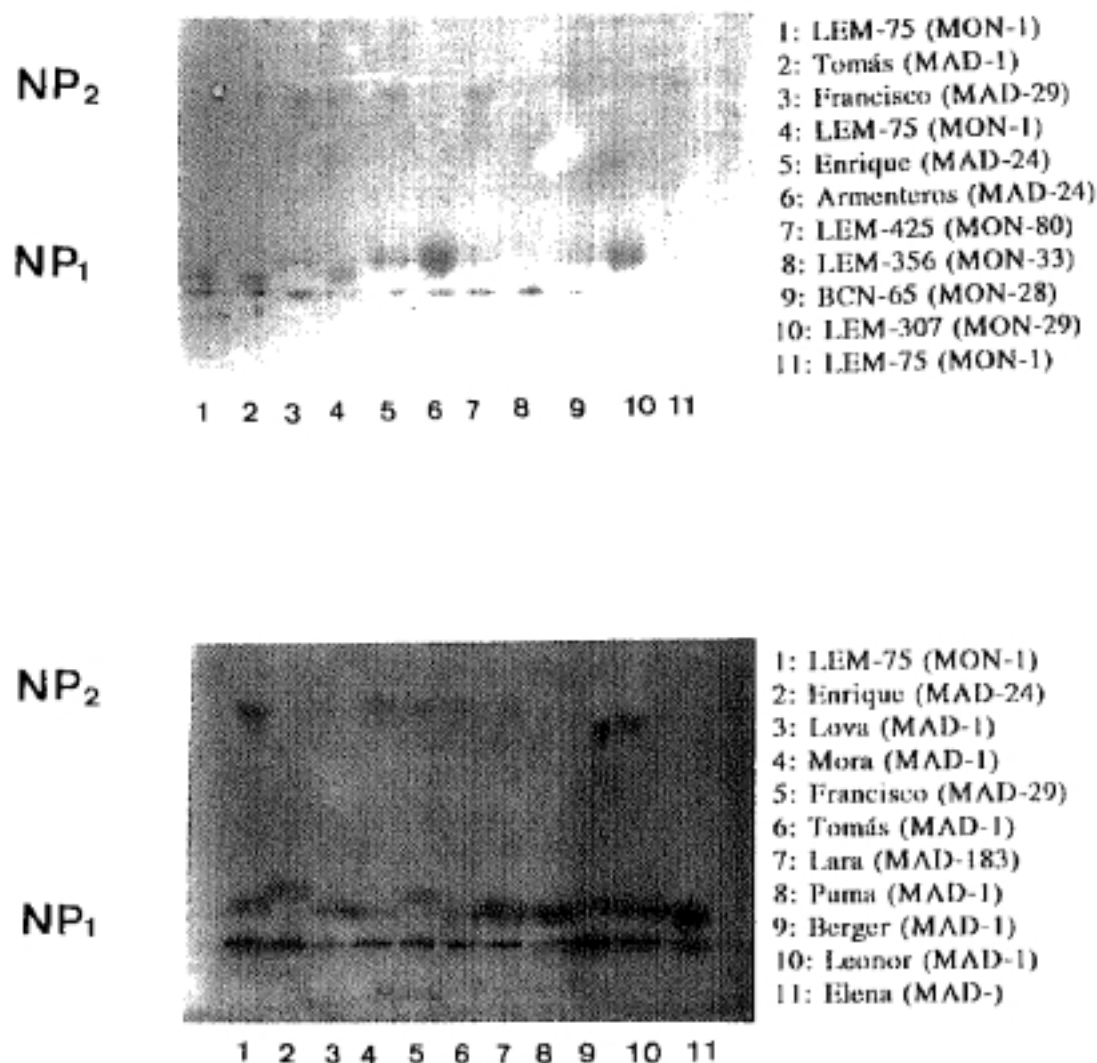
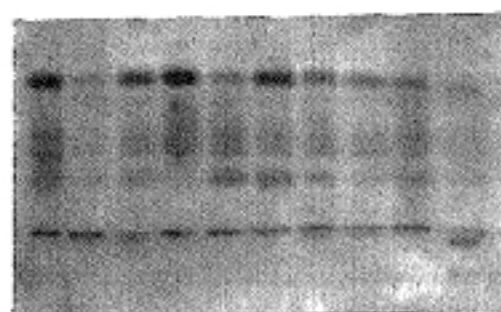


Figura 10.- Electromorfos obtenidos para el sistema enzimático NP.

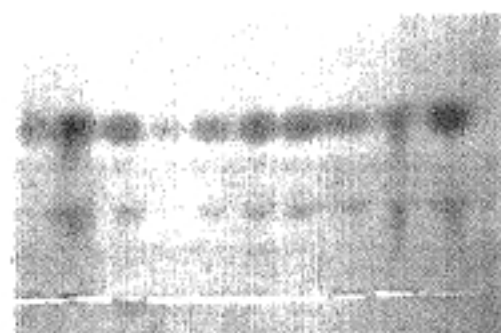
EM



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: Tejúcar (MAD-33)
- 3: Anastasio (MAD-33)
- 4: Carrasco (MAD-1)
- 5: Arenas (MAD-24)
- 6: Zamora (MAD-34)
- 7: Javier (MAD-34)
- 8: Garrido (MAD-183)
- 9: Santo (MAD-33)
- 10: Espín (MAD-1)

MPI



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

- 1: Elena (MAD-1)
- 2: Berger (MAD-1)
- 3: Leonor (MAD-1)
- 4: Puma (MAD-1)
- 5: Lara (MAD-183)
- 6: Tomás (MAD-1)
- 7: Francisco (MAD-29)
- 8: Mora (MAD-1)
- 9: Enrique (MAD-24)
- 10: LEM-75 (MON-1)

DIA

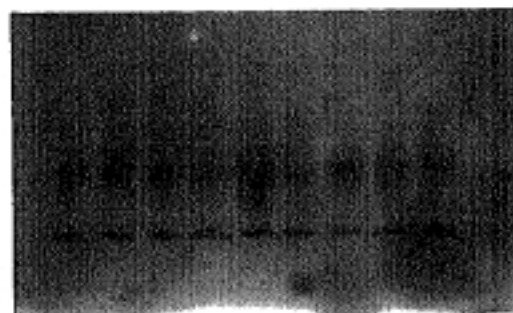


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

- 1: Espín (MAD-1)
- 2: Santo (MAD-33)
- 3: Garrido (MAD-183)
- 4: Javier (MAD-34)
- 5: Zamora (MAD-34)
- 6: Arenas (MAD-24)
- 7: Carrasco (MAD-1)
- 8: Anastasio (MAD-33)
- 9: Tejúcar (MAD-33)
- 10: LEM-75 (MON-1)

Figura 11.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos EM, MPI y DIA.

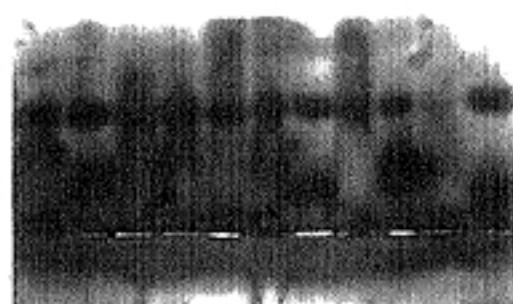
DIA



1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1: Clemente (MAD-24)
- 2: Justo (MAD-24)
- 3: Cuadros (MAD-183)
- 4: Arce (MAD-28)
- 5: Manu (MAD-1)
- 6: Rojas (MAD-24)
- 7: Palma (MAD-29)
- 8: Ant3nez (MAD-24)
- 9: LEM-75 (MON-1)

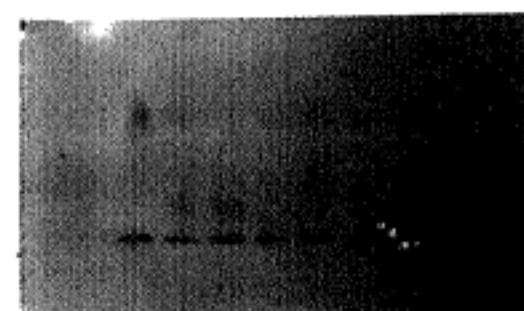
ICD



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: LEM-307 (MON-29)
- 3: LEM-356 (MON-33)
- 4: BCN-65 (MON-28)
- 5: LEM-425 (MON-80)
- 6: Palma (MAD-29)
- 7: Ant3nez (MAD-24)
- 8: Egido (MAD-1)
- 9: Navarro (MAD-183)
- 10: Kulay (MAD-1)
- 11: Arroyo (MAD-1)

FH



1 2 3 4 5 6 7

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: Esp3n (MAD-1)
- 3: Garrido (MAD-183)
- 4: Carrasco (MAD-1)
- 5: Arenas (MAD-24)
- 6: Zamora (MAD-34)
- 7: Javier (MAD-24)

Figura 12.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzim3ticos DIA, ICD y FH.

TABLA 21.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunosuprimidos.

AISLADOS	GRUPO DE RIESGO	GRUPO VIH DEL CDC ^a	CODIGO	ORIGEN	ZM
A) LV y VIH+					
- Médula					
Antonio	ADVP	-	MHOM/ES/88/LLM-150	Cuenca	1
Daniel	-	-	MHOM/ES/88/LLM-175	Madrid	501
58140	-	-	MHOM/ES/90/LLM-195	Madrid	1
59933	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/90/LLM-200	Madrid	33
Milagros	-	-	MHOM/ES/88/LLM-180	Madrid	1
Jesús	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/88/LLM-190	Cuenca	1
5825	-	-	MHOM/ES/91/LLM-205	Madrid	33
Espín	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-335	Madrid	1
Garrido	Hemofílico	IVC-2	MHOM/ES/92/LLM-336	Jaén	183
Tejucar	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-304	Madrid	33
Carrasco	-	II	MHOM/ES/92/LLM-320	Mallorca	1
Anastasio	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-312	Madrid	33
Antunez	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-313	Madrid	24
Palma	-	-	MHOM/ES/91/LLM-310	Mallorca	29
Cuadros*	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-340	Madrid	183
Justo	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-341	Fuentidueña	24
Clemente	ADVP	II	MHOM/ES/91/LLM-301	Madrid	24
Natalio	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-311	Madrid	29
Massa	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-299	Mallorca	34
Ribas	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-300	Mallorca	1
Esteso	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-306	Madrid	1
Angel	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-316	Vallecas	33
Armenteros	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-315	Madrid	24
Arroyo	-	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-303	Fuenlabrada	1
Cejas	Homosexual	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-330	Mallorca	1
Enrique	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-331	Madrid	24
Francisco	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-309	Alicante	29
Tomás	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-326	Madrid	1
Moreno	ADVP	IVC-2	MHOM/ES/93/LLM-384	Madrid	24
Lara	ADVP	-	MHOM/ES/93/LLM-382	Córdoba	183
Berger	Homosexual	IVD	MHOM/ES/93/LLM-383	Madrid	1
Leonor*	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-386	Madrid	1
Vélez	Homosexual	II	MHOM/ES/92/LLM-373	Madrid	501
Ana	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/91/LLM-325	Madrid	?
- Punción esplénica					
Arce	ADVP	-	MHOM/ES/92/LLM-370	Alicante	28

* Asintomático

a: CDC (Centers for Disease Control) (1986, 1987)

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral

TABLA 21.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunosuprimidos.

AISLADOS	GRUPO DE RIESGO	GRUPO VIH DEL CDC ^a	CODIGO	ORIGEN	ZM
A) LV y VIH +					
- Monocitos de sangre periférica					
Rojas	ADVP	II	MHOM/ES/92/LLM-337	Madrid	24
Manu	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-323	Madrid	1
Mora	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-372	St ^a Eugenia	1
Puma	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/93/LLM-389	Madrid	1
- Sangre total					
Lova	ADVP	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-339	Vicálvaro	1
- Xenodiagnóstico					
Santo	ADVP	IVC-2	MHOM/ES/91/LLM-47	Madrid	33
Jiro	Heterosexual	IVC-1	MHOM/ES/92/LLM-333	Cuenca	1
B) LC y VIH +					
- Biopsia de piel					
Oscar	ADVP	-	MHOM/ES/88/LLM-116	Madrid	33
Egido	Homosexual	-	MHOM/ES/93/LLM-394	Madrid	1
Navarro*	ADVP	-	MHOM/ES/93/LLM-395	Madrid	183
C) LV y otro tipo de inmunosupresión					
- Médula					
Elena			MHOM/ES/91/LLM-329	Madrid	1

* Asintomático

a: CDC (Centers for Disease Control) (1986, 1987)

ADVP: Adicto a drogas por vía parenteral

TABLA 22.- Características de los aislados de *Leishmania* de sujetos inmunocompetentes.

AISLADOS	CODIGO	ORIGEN	ZM
D) LV			
- Médula			
Azañedo	MHOM/ES/87/LLM-33	Segovia	1
Seguí	MHOM/ES/91/LLM-327	Menorca	34
Kalay	MHOM/ES/93/LLM-391	Madrid	1
- Xenodiagnóstico			
Lang	MHOM/ES/93/LLM-392	Boadilla (Madrid)	24
E) LC			
- Biopsia de piel			
Javier	MHOM/ES/92/LLM-332	Tres Cantos (Madrid)	34
Zamora	MHOM/ES/92/LLM-318	Madrid	34
Arenas	MHOM/ES/92/LLM-317	Móstoles (Madrid)	24

Tabla 23.- Número de zimodemas encontrado dentro de cada uno de los grupos.

	ZIMODEMAS							
	MAD-1	MAD-24	MAD-28	MAD-29	MAD-33	MAD-34	MAD-183	MAD-501
AISLADOS								
LV y VIH+ (41)	18	7	1	3	6	1	3	2
LC y VIH+ (3)	1	-	-	-	1	-	1	-
LV y otra inmunosupresión (1)	1	-	-	-	-	-	-	-
LV (4)	2	1	-	-	-	1	-	-
LC (3)	-	1	-	-	-	2	-	-



Figura 13.- Distribución geográfica de los zimodemas descritos en este trabajo.

4.1.2.2.- Relaciones filogenéticas: Dendograma

En la Figura 14 aparece el dendograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del polimorfismo enzimático aplicando el coeficiente de distancia de Jaccard D(J), mediante el programa de taxonomía numérica TAXONOMIE (Serres y Roux, 1986), para el conjunto de aislados tanto de sujetos inmunocompetentes como inmunodeprimidos y cepas de referencia (apartado 3.5.1. de Material y Métodos). La distancia media para el grupo de aislados de sujetos VIH+ fue de 0'23, situándose la distancia máxima en 0'40 (entre MAD-1 y MAD-501) y la mínima en 0'11 (entre MAD-1 y MAD-34). Para el grupo de inmunocompetentes la distancia media fue de 0'15, siendo la distancia máxima de 0'22 (entre MAD-1 y MAD-24) y la mínima en 0'11 (entre MAD-1 y MAD-34).

4.1.2.3.- Análisis de genética de poblaciones

Las pruebas descritas en el apartado 3.5.2.2. de Material y Métodos se han llevado a cabo sobre el grupo de aislados de sujetos VIH+ por ser un grupo con parecidas características epidemiológicas.

Todas las pruebas, d1, d2, e y f han sido significativas para el grupo de aislados estudiados que si la población fuera panmíctica (hipótesis nula) la probabilidad de observar un zimodema o genotipo multilocus dado en cantidad igual o superior al que es efectivamente observado, será de $1'65 \times 10^{-4}$ ($p < 0'02$) (Prueba d1). La probabilidad de observar no importa cuál zimodema o genotipo multilocus en un número igual o superior al del genotipo más abundante en la muestra (Test d2) será de $p=0'008$ ($p < 0'02$). La prueba e fue significativa, la probabilidad de observar un número de genotipos multilocus o zimodemas diferentes igual o inferior al que es observado en la muestra será de $p=0'0014$ ($p < 0'02$). La prueba f fue significativa observandose un desequilibrio de ligazón igual o superior al que es efectivamente observado en la muestra.

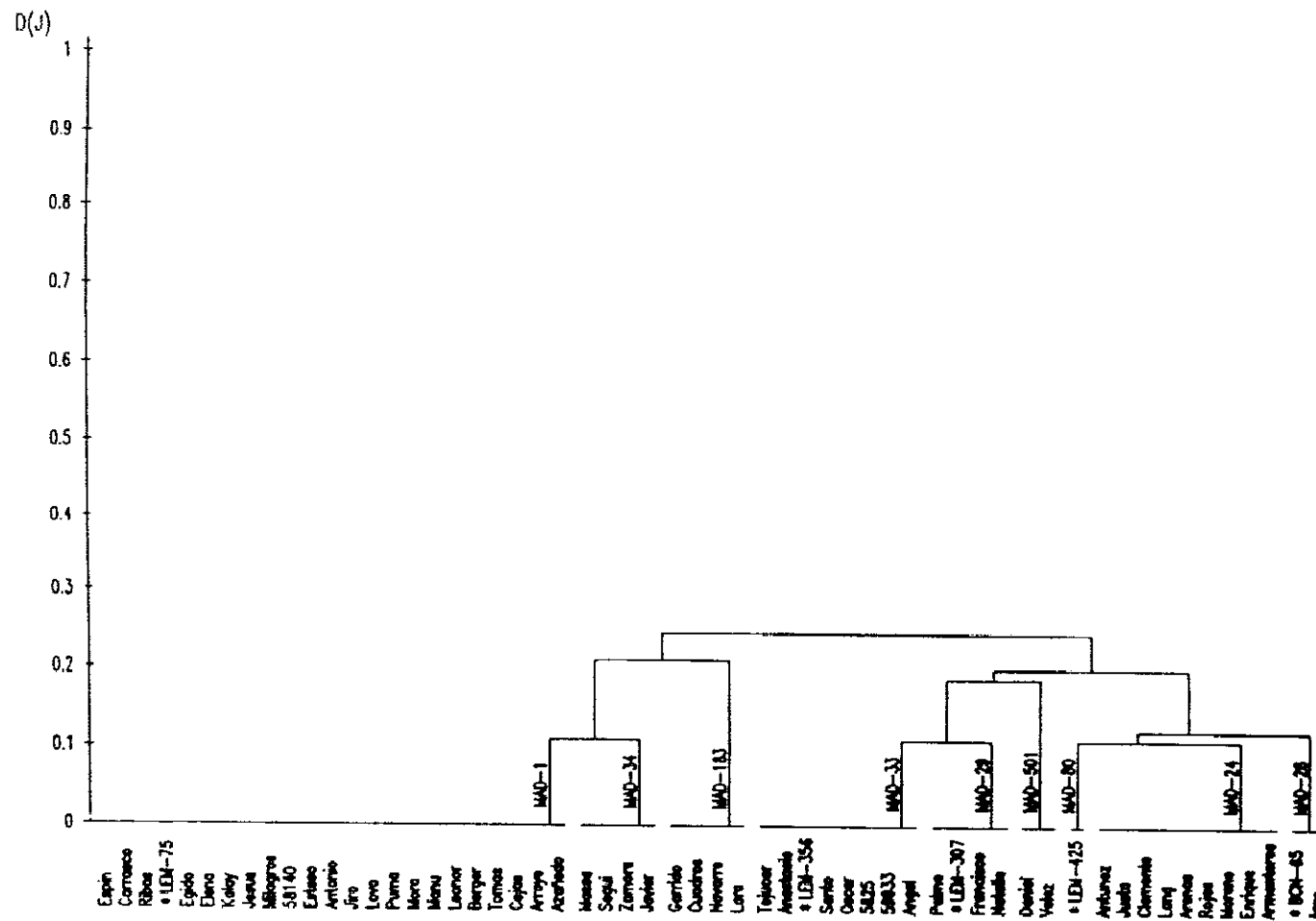


Figura 14.- Dendrograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del estudio del polimorfismo enzimático utilizando el programa de taxonomía numérica TAXONOMIE y aplicando el índice de distancia de Jaccard $D(J)$.

4.2.- Caracterización mediante RAPD

Mediante la técnica de amplificación de ADN con iniciadores arbitrarios (RAPD) se han analizado un total de 50 aislados de *Leishmania*, 40 de ellos incluidos en el grupo A (LV y VIH+), 3 aislados del grupo B (LC y VIH+), el aislado incluido en el grupo C, 3 aislados del grupo D (LV) y 3 aislados del grupo E (LC); además se estudiaron 15 cepas de referencia: 5 cepas de referencia de zimodemas de *L. (L.) infantum* presentes en España (LEM-75, BCN-65, LEM-307, LEM-356, BCN-32), 5 cepas de referencia de especies del Viejo Mundo (LRC-137, K-27, DD8, LRC-133, IPT-1) y 5 cepas de especies del Nuevo Mundo (M-2903, M-1176, M-379, PH-8, PP-75). Las características de cada uno de los aislados y cepas de referencia aparecen en las Tablas 1, 2 y 3 de Material y Métodos. El estudio se realizó utilizando 7 iniciadores (A1, A2, A5, A7, A10, A12 y A15) según se explica en el punto 3.4. de Material y Métodos.

4.2.1.- Variabilidad

En las Figuras 15, 16, 17, 18 y 19 se muestran los patrones obtenidos con los primers A1, A2, A5, A7, A10, A12 y A15. En la Tabla 24 se muestran los resultados correspondientes a las lecturas de los perfiles obtenidos con cada uno de los iniciadores para los aislados y cepas de referencia estudiados en función del número de bandas.

Todos los iniciadores utilizados permitieron diferenciar los complejos *L. infantum* y *L. donovani* del resto de las especies. El perfil obtenido con el iniciador A15 para los aislados de *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi* (PP-75) fue diferente del observado para las cepas de *L. (L.) donovani* (LRC-133, DD-8).

La variabilidad ha sido muy elevada en el total de aislados caracterizados (50 aislados) encontrándose 41 genotipos multilocus diferentes. Dentro del grupo de aislados de *Leishmania* de sujetos VIH+ (43 aislados) el número de genotipos multilocus fue de 36. Los iniciadores A1, A2, A5, A10, A12 y A15 han sido polimórficos para *L. (L.) infantum*. El iniciador A7 ha sido monomórfico para el grupo de aislados de *L. (L.) infantum*.

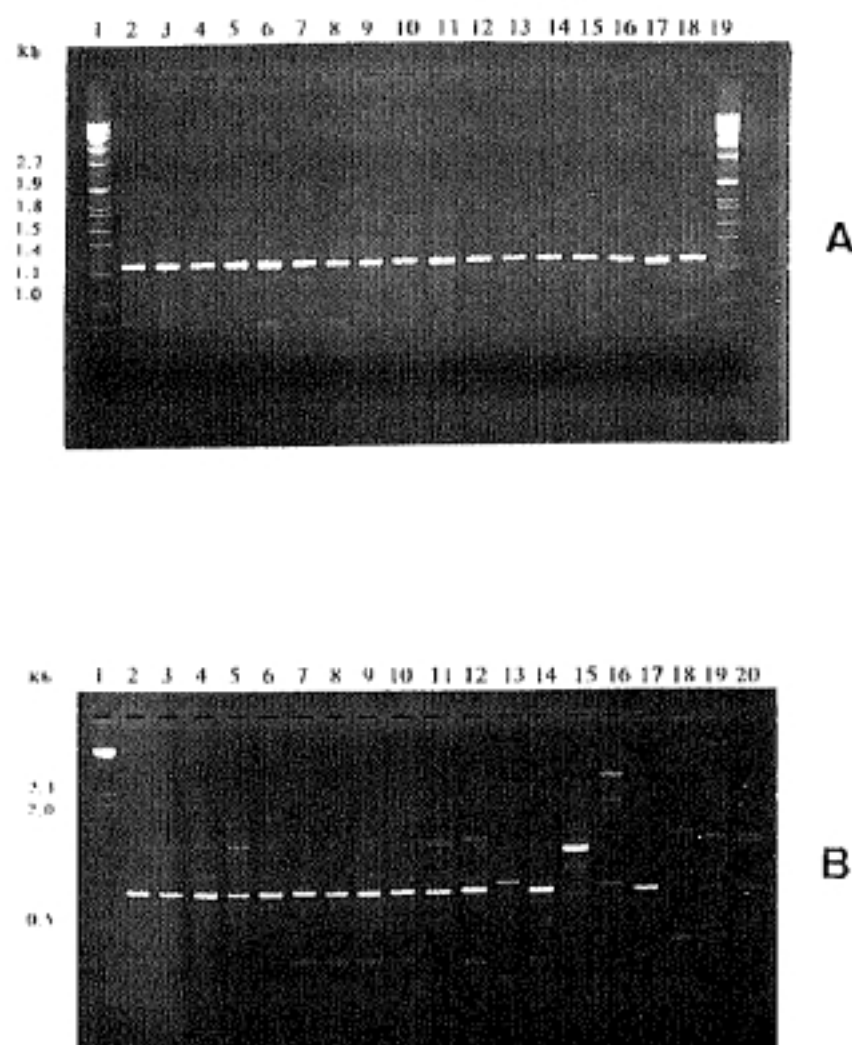


Figura 15.- Patrón obtenido con el iniciador A1. (A) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago SSP1 digerido con EcoR1; 2.- Espín; 3.- Garrido; 4.- Tejúcar; 5.- Carrasco; 6.- Anastasio; 7.- Antúñez; 8.- Palma; 9.- Cuadros; 10.- Justo; 11.- Clemente; 12.- Massa; 13.- Ribas; 14.- Estesio; 15.- Angel; 16.- Armenteros; 17.- Arroyo; 18.- Natalio; 19.- Marcador de peso molecular, ADN del fago SSP1 digerido con EcoR1. (B) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstEII; 2.- Francisco; 3.- Tomás; 4.- Moreno; 5.- Lara; 6.- Berger; 7.- LEM-307; 8.- LEM-75; 9.- LEM-356; 10.- BCN-65; 11.- BCN-32; 12.- DD8; 13.- K-27; 14.- IPT-1; 15.- LRC-137; 16.- M-379; 17.- PP-75; 18.- PH8; 19.- M-2903; 20.- M-1176.

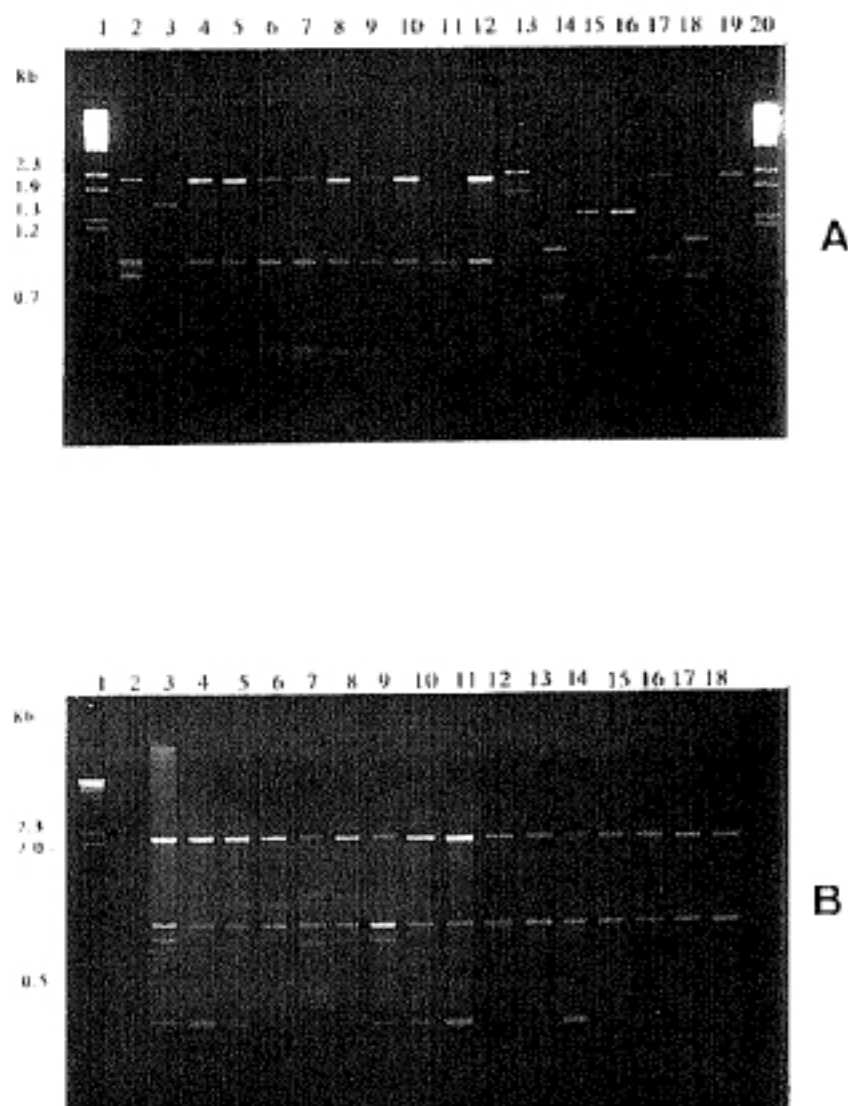


Figura 16.- Patrón obtenido con el iniciador A5. (A) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- Cejas; 3.- Arroyo; 4.- Berger; 5.- Palma; 6.- Clemente; 7.- LEM-356; 8.- BCN-65; 9.- BCN-32; 10.- DD8; 11.- K-27; 12.- IPT-1; 13.- LRC-137; 14.- M-379; 15.- Lbb; 16.- Lbg; 17.- LRC-133; 18.- PH8; 19.- PP-75; 20.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII. (B) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con HindIII; 2.- Control sin ADN; 3.- Leonor; 4.- Vélez; 5.- Rojas; 6.- Manu; 7.- Mora; 8.- Puma; 9.- Arce; 10.- Lova; 11.- Navarro; 12.- Jiro; 13.- Antonio; 14.- Daniel; 15.- 58140; 16.- 59933; 17.- Milagros; 18.- Jesús.

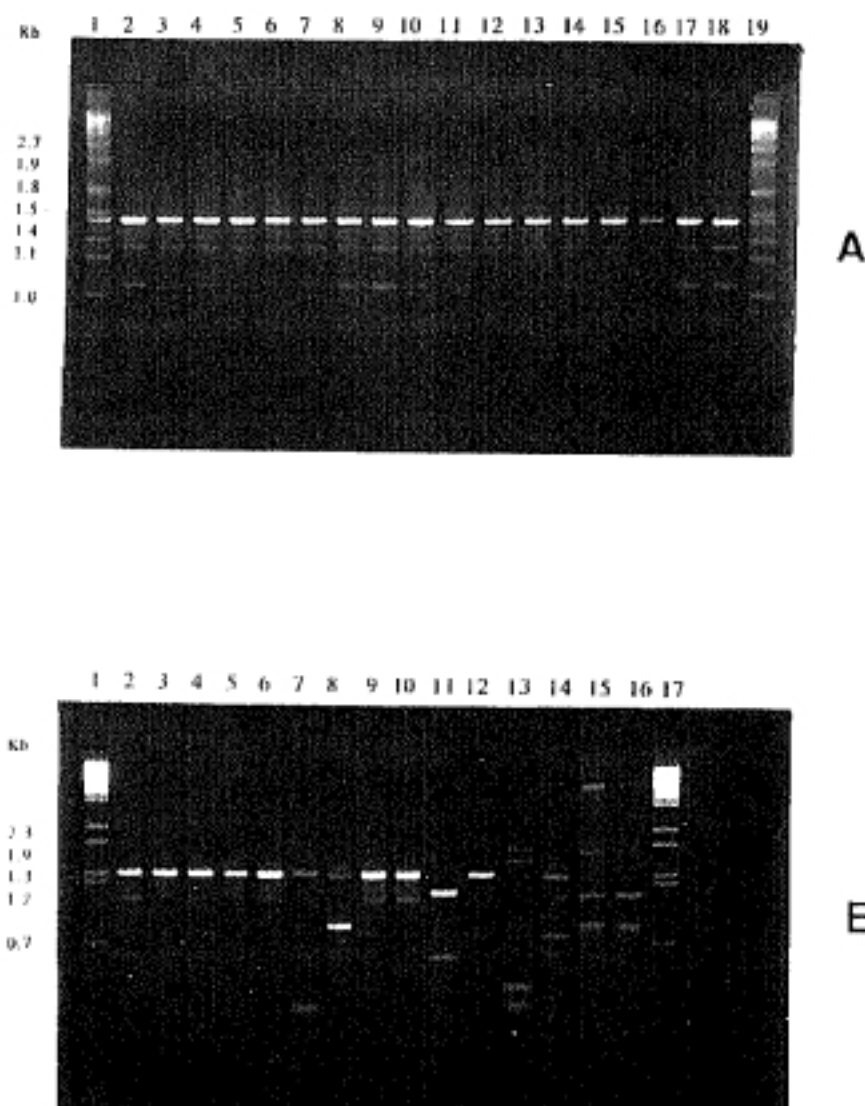
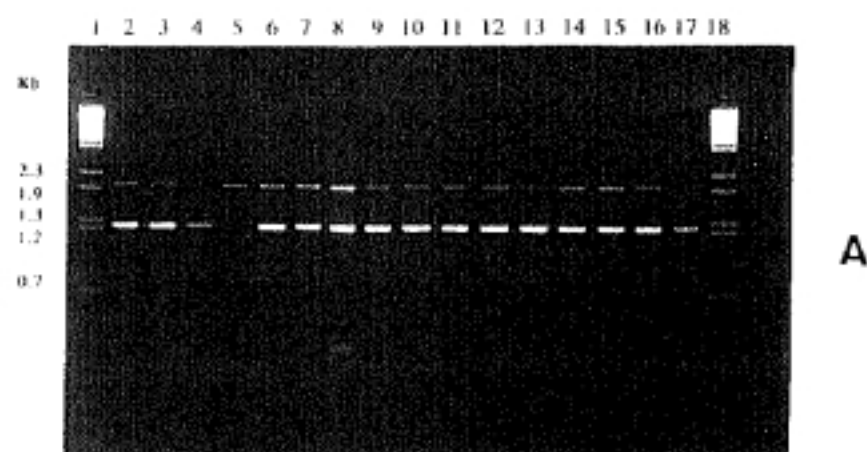
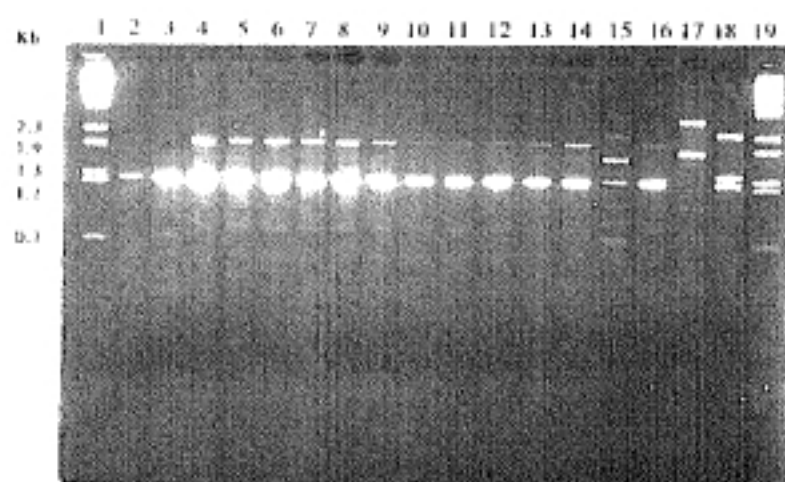


Figura 17.- Patrón obtenido con el iniciador A7. (A) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago SSP1 digerido con EcoR1; 2.- Espín; 3.- Garrido; 4.- Tejúcar; 5.- Carrasco; 6.- Anastasio; 7.- Antúñez; 8.- Palma; 9.- Cuadros; 10.- Justo; 11.- Clemente; 12.- Massa; 13.- Ribas; 14.- Estesos; 15.- Angel; 16.- Armenteros; 17.- Arroyo; 18.- Natalio; 19.- Marcador de peso molecular, ADN del fago SSP1 digerido con EcoR1. (B) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- 5825; 3.- Santo; 4.- Javier; 5.- Arenas; 6.- Elena; 7.- LRC-133; 8.- PH8; 9.- PP-75; 10.- DD8; 11.- K-27; 12.- IPT-1; 13.- LRC-137; 14.- M-379; 15.- M-2903; 16.- M-1176; 17.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII.



A



B

Figura 18.- Patrón obtenido con el iniciador A10. (A) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- Leonor; 3.- Vélez; 4.- Rojas; 5.- Manu; 6.- Mora; 7.- Puma; 8.- Arce; 9.- Lova; 10.- Navarro; 11.- Jiro; 12.- Antonio; 13.- Daniel; 14.- 59933; 15.- 58140; 16.- Milagros; 17.- Jesús; 18.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII. (B) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- Cejas; 3.- Enrique; 4.- Francisco; 5.- Tomás; 6.- Moreno; 7.- Lara; 8.- Berger; 9.- LEM-307; 10.- LEM-75; 11.- LEM-356; 12.- BCN-65; 13.- BCN-32; 14.- DD8; 15.- K-27; 16.- IPT-1; 17.- LRC-137; 18.- M-379; 19.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII.

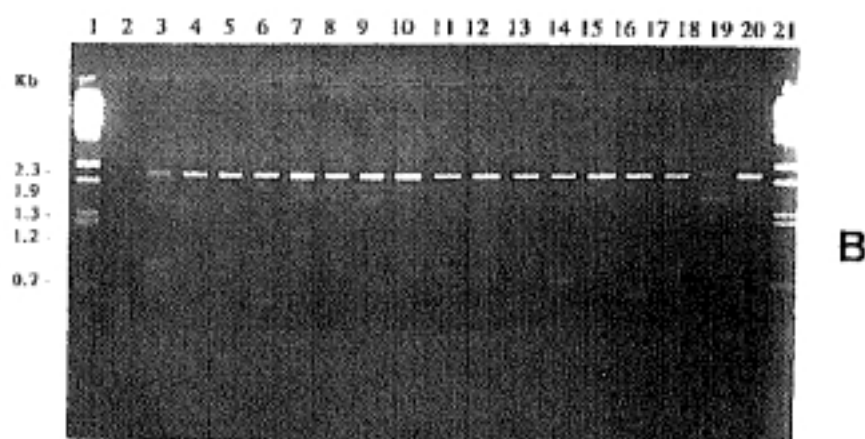
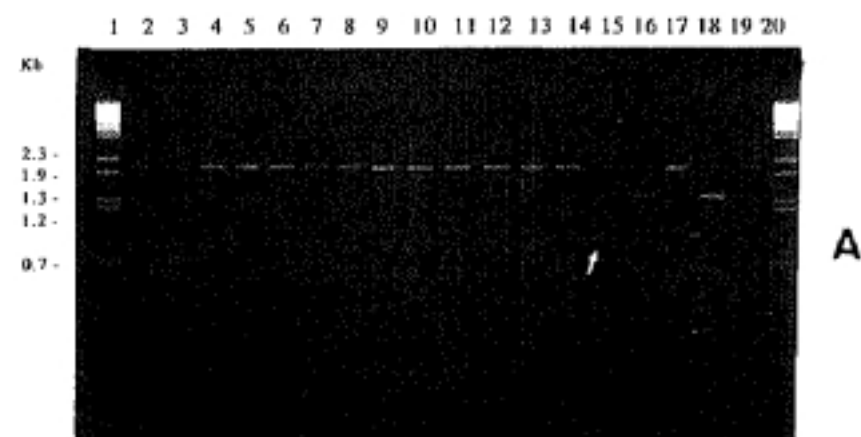


Figura 19.- Patrón obtenido con el iniciador A15. (A) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- Control sin ADN; 3.- Cejas; 4.- Enrique; 5.- Francisco; 6.- Tomás; 7.- Moreno; 8.- Lara; 9.- Berger; 10.- LEM-307; 11.- LEM-75; 12.- LEM-356; 13.- BCN-65; 14.- BCN-32; 15.- DD8; 16.- K-27; 17.- IPT-1; 18.- LRC-137; 19.- PP-75; 20.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII. (B) 1.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII; 2.- control sin ADN; 3.- Espín; 4.- Garrido; 5.- Tejúcar; 6.- Carrasco; 7.- Anastasio; 8.- Antúñez; 9.- Palma; 10.- Cuadros; 11.- Justo; 12.- Clemente; 13.- Massa; 14.- Ribas; 15.- Estesio; 16.- Angel; 17.- Armenteros; 18.- Arroyo; 19.- Natalio; 20.- Marcador de peso molecular, ADN del fago lambda digerido con BstII.

TABLA 24.- Genotipos obtenidos a partir de las lecturas de los perfiles con cada uno de los iniciadores.

	A1	A2	A5	A7	A10	A12	A15
Espin	7-13-17	12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Garcido	13-17	4-7-12	3-15-27	9-15-19	14	99	2
Teucar	7-13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	99	2
Canaspo	7-13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	99	2
Anastasio	13-17	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	99	2
Antunez	13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Palma	7-13-17	4-7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2-3
Cuadros	7-13	4-7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Justo	13	7-9-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Clemente	13	7-9-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Masaa	13	7-9-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Ribas	7-13	4-7-9-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Esteso	7-13	4-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Angel	13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Amenteros	7-13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Arroyo	13	12	5-12-15	9-15-19	8-14	8	2-3
Natalio	13-17	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Cejas	7-13-17	4-7-9-12	3-15-19-24-27	9-15-19	14	8	2
Banque	13	4-7-12	8-10-15	9-15-19	14	5-8	2
Francisco	7-13-17	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	8	2
Tomas	7-13	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	8	2
Moreno	7-13	7-12	3-9-10-15	9-15-19	8-14	8	2
Lara	7-13	4-7-12	3-8-10-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Berger	13	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	9	2
Leonor	5-13	7-12	3-15-17-27	9-15-19	8-14	9	2
Velaz	13	4-12	3-15-17-27	9-15-19	8-14	8	2
Rojas	7-13	7-12	3-10-15-27	9-15-19	14	8	2
Manu	7-13	5-7-19	3-10-15	9-15-19	8	9	2
Mora	7-13	4-7-9-11-12	3-8-10-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Puma	13	4-7-12	3-9-15-17	9-15-19	8-14	8	2
Aice	13	4-7-12	3-9-15-17	9-15-19	8-14	99	2
Loya	13-15	99	3-15	9-15-19	8-14	5-9	2
Navarro	13-17	12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
Jiro	13-17	12	3-15	9-15-19	8-14	9	2
Antonio	13-17	12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Daniel	13-17	99	3-12-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2-3
58140	13-17	7-12	3-15	9-15-19	8-14	9	2
59933	13-17	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Mila	13-17	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Jesus	13-17	7-12	3-15	9-15-19	14	8	2
5825	13-17	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Oscar	13	4-7-9-12	3-5-15-17	9-15-19	8-14	5-8	2
Santo	13-17	4-7-9-12	3-15	9-15-19	14	5-8	2
Javier	13-17	4-7-9-12	3-5-15-17-26-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Zamora	13	4-7-9-12	3-10-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Arenas	7-13	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Segui	13-17	4-7-12	3-15	9-15-19	8-14	5-8	2
Lang	7-13-17	12	3-10-15-24-25-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Kauay	7-13	12	3-15-22-27	9-15-19	8-14	5-8	2
Elena	13	7-12	3-15-27	9-15-19	14	8	2
LEM-75	13-17	4-12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
LEM-356	13-17	4-7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
LEM-307	13-17	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
BCN-65	13-17	4-7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	9	2
BCN-32	7-13	12	3-15-27	9-15-19	8-14	5-8	2
DD-8	5-13-17	99	3-15	9-15-19	8-14	8	6
K-27	11-18	1-10	18-18	12-21	2-7-10-14	7	4
PT-1	13-17	7-12	3-15-27	9-15-19	8-14	8	2
LRC-137	8-9-14	1-2-8	2-4-15	4-6-16-22-23	3-9	10	5
M-379	1-12	3-10-13-14-15-20	1-6-13-14-21-23	11-14-20	6-13-18	1-6	99
PH-8	2-16	3-14-17	7-11-20	7-8-10-16	4-14	2-6	99
PP-75	13-17	7-12	3-15	9-15-19	14	5	2
LDD	3-10-14	1-6-10-13-16-18	6	2-3-5-13-17	1-5-11-12-15	3-4	1
Lbg	4-6-10-14	1-6-10-13-16-18	6	1-3-5-13-18	1-5-11-12-15	3-4	1
LRC-133	13-17	99	3-15-19	9-24	14	99	6

4.2.2.- Relaciones filogenéticas: Dendograma

En la Figura 20 se muestra el dendograma construido a partir de las matrices de distancias obtenidas en función del número de bandas (apartado 3.5.1. de Material y Métodos), aplicando el coeficiente de distancia de Jaccard $D(J)$ mediante el programa de taxonomía numérica TAXONOMIE (Serres y Roux, 1986) al conjunto de aislados, tanto de sujetos inmunocompetentes como inmunodeprimidos y cepas de referencia. La distancia media para el grupo de aislados de sujetos VIH+ fue de 0'29, la máxima se situó en 0'65 (entre los aislados Manu, MAD-1 y Arroyo, MAD-1) y la mínima en 0'066 (entre Espín, MAD-1 y BCN-32, MAD-33). Para el grupo de inmunocompetentes la distancia media situó en 0'30, siendo la máxima de 0'42 (entre Lang, MAD-24 y Javier, MAD-34) y la mínima de 0'12 (entre Arenas, MAD-24 y Seguí, MAD-34).

4.2.3.- Análisis de genética de poblaciones

Las pruebas de genética de poblaciones se explicaron en el apartado 3.5.2. de Material y Métodos, estas pruebas se han realizado sobre los aislados incluidos en los grupos A y B (VIH+) que reúnen similares características epidemiológicas igual que en caso de la caracterización enzimática. Sólo las pruebas, d1 y e han sido significativas para el grupo de aislados estudiados. Las pruebas d2 y f no han sido significativas. La probabilidad de observar un genotipo multilocus o rapdema dado en cantidad igual o superior al que es efectivamente observado ha sido de $3'5 \times 10^{-4}$ ($p < 0'02$) (Prueba d1). La prueba e fue significativa: la probabilidad de observar un número de genotipos multilocus o rapdemas diferentes igual o inferior al que es observado en la muestra fue de $p=0'0015$ ($p < 0,02$).

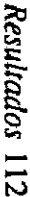


Figura 20.- Dendograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos obtenidos con RAPD utilizando el programa de taxonomía numérica TAXONOMIE y aplicando el índice de distancia de Jaccard $D(J)$.

4.3. Caracterización mediante sondas de ADN

Se han caracterizado mediante la sonda de ADN_g 7-059 específica para el complejo de *L. donovani* s.l. y la sonda pDK20 específica para *L. (L.) infantum*, una serie de aislados humanos con el fin de estudiar los patrones de hibridación en términos de variabilidad. Las características de las dos sondas utilizadas se recogen en el apartado 3.3.7. correspondiente a Material y Métodos.

4.3.1.- Caracterización mediante sondas de ADN_g

Los ADN_g de los aislados estudiados se digirieron con los enzimas de restricción Pst-1, para ser estudiados con la sonda 7-059 y con HindIII/BamHI para ser estudiados con la sonda pDK20. Posteriormente se sometieron a electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron a filtros de nylon por capilaridad según Southern (1975). A continuación se hibridaron con las sondas de ADN_g según se explica en el apartado correspondiente de Material y Métodos.

4.3.1.1.- Caracterización de aislados humanos con la sonda 7-059

El patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059 para alguno de los aislados se muestra en la Figura 21. Las bandas de 6.3, 3.0, 1.6, 1.4 y 0.8 kb son características para el complejo de *Leishmania donovani* s.l. (Van Eys *et al.*, 1989). En la Figura 22 se muestra un diagrama con el patrón de hibridación obtenido para cada uno de los aislados y cepas de referencia estudiadas. La diferencias observadas en los patrones de hibridación nos permitió establecer cierto grado de variabilidad entre los aislados estudiados. El dendograma construido a partir de la matriz de similaridad aplicando en índice de Jaccard mediante el programa de taxonomía TAXAN se muestra en la Figura 23. Todos los aislados estudiados quedaron separados en 5 genotipos: A, B, C, D y E.

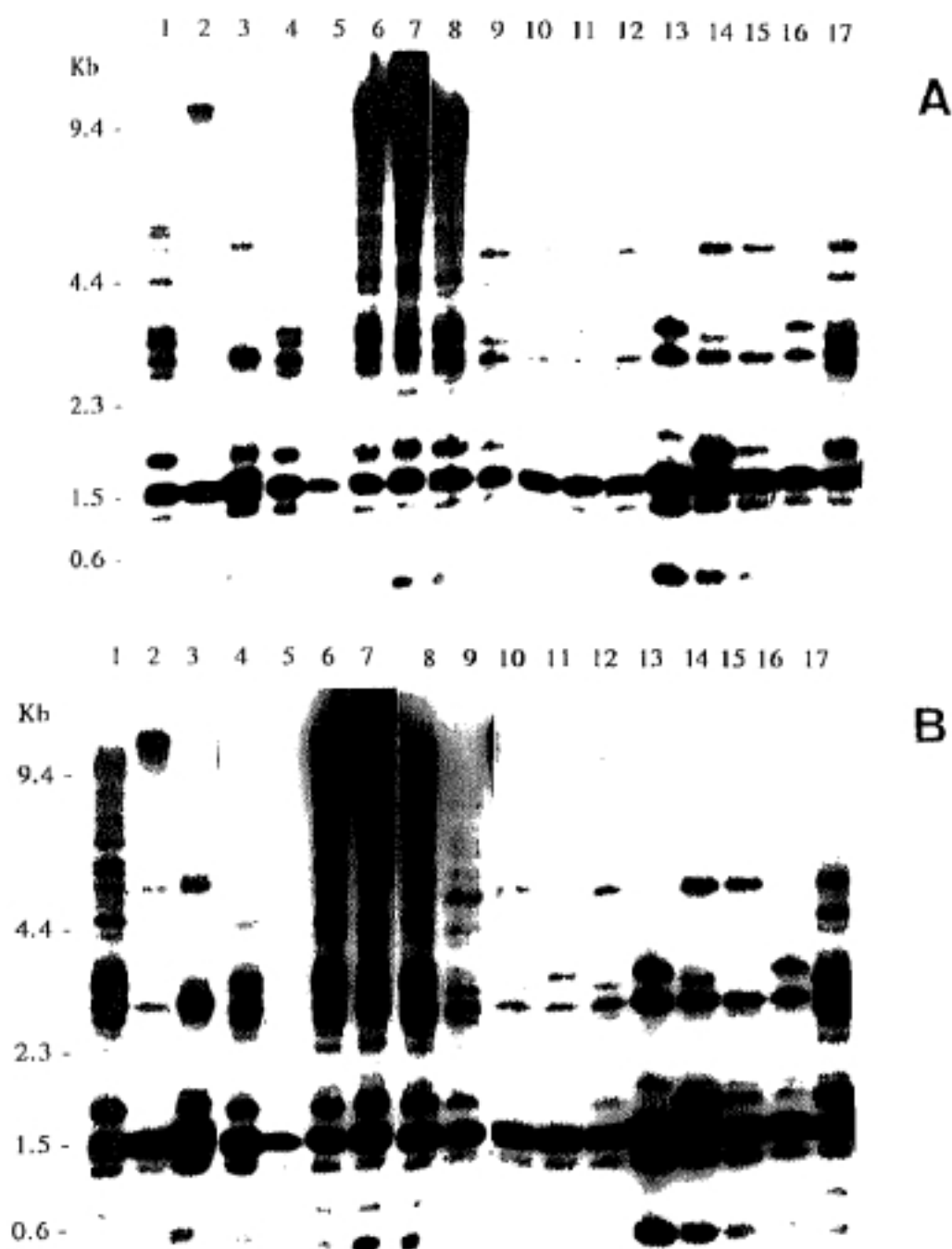


Figura 21.- A) Patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059 de los ADN_g digeridos con el enzima PstI. 1.- Espñ; 2.- Garrido; 3.- Tejúcar; 4.- Carrasco; 5.- Anastasio; 6.- Antúnez; 7.- Palma, 8.- Cuadros; 9.- Natalio; 10.- Massa; 11.- Estesio; 12.- Clemente; 13.- Angel; 14.- Armenteros; 15.- LEM-425; 16.- LEM-356; 17.- LEM-307; 18.- BCN-65. B) Igual que A pero con distintas condiciones de exposición fotográfica.

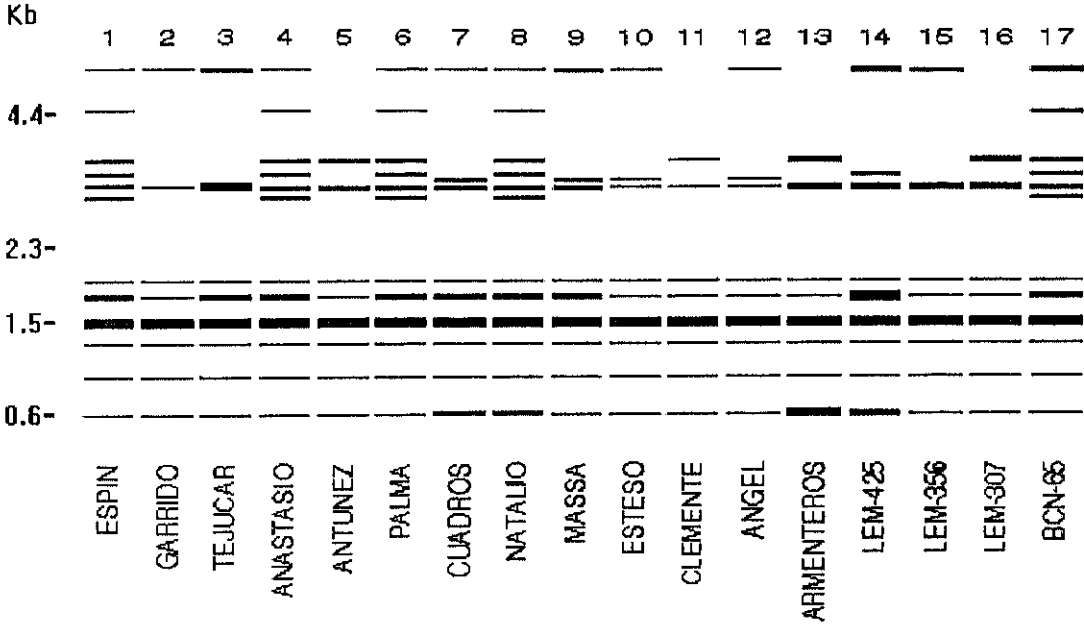


Figura 22.- Diagrama correspondiente al patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059 (ver Figura 21).

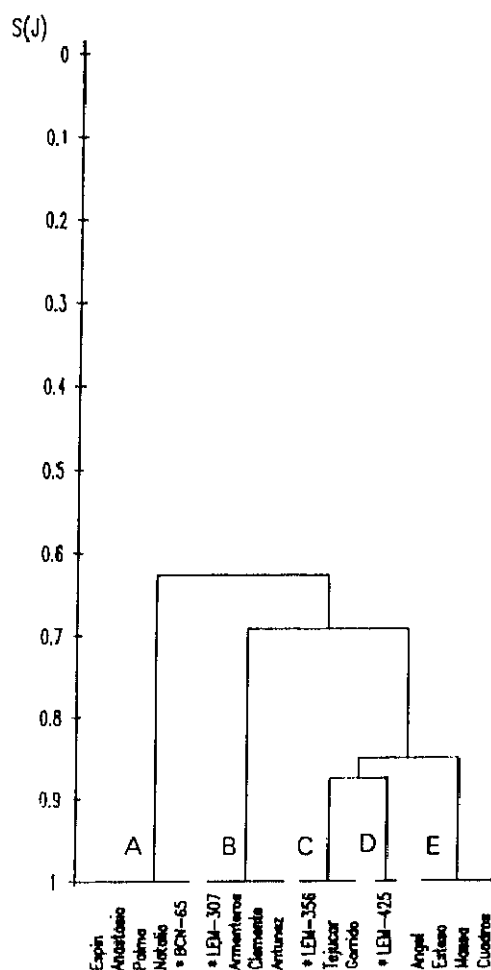


Figura 23.- Dendrograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del polimorfismo enzimático utilizando el programa de taxonomía TAXAN aplicando el índice de similaridad de Jaccard $S(J)$.

4.3.1.2.- Caracterización de aislados humanos con la sonda *pdK20*

El patrón de la hibridación correspondiente a los aislados estudiados se muestra en la Figuras 24 y 25. En la Figura 26 se muestra un diagrama del patrón de hibridación obtenido. Con esta sonda se obtiene un patrón característico para *L. (L.) infantum* (Van Eys *et al.*, 1991). Todos los aislados estudiados presentaron la banda característica para *L. (L.) infantum* de 18 kb. Sin embargo pudimos observar como algunos aislados presentaban una banda de 4 kb característica junto con la de 14 kb para *L. (L.) donovani* (Van Eys *et al.*, 1991). Además es de destacar la presencia de dos bandas de 17 y 16 kb en la cepa de referencia LEM-425 (MON-80). El dendograma construido a partir de la matriz de similaridad obtenida aplicando el coeficiente de distancia de Jaccard mediante el programa de taxonomía TAXAN se muestra en la Figura 27. Todos los aislados estudiados quedaron agrupados en dos genotipos próximos entre sí, siendo la similaridad entre ambos de 0'750. Cada uno de los genotipos agrupó a aislados pertenecientes a diferentes zimodemas. La cepa de referencia LEM-425 (MON-80), argelina, quedó individualizada, siendo la similaridad en relación a los otros dos grupos de 0'5 y 0'6 respectivamente.

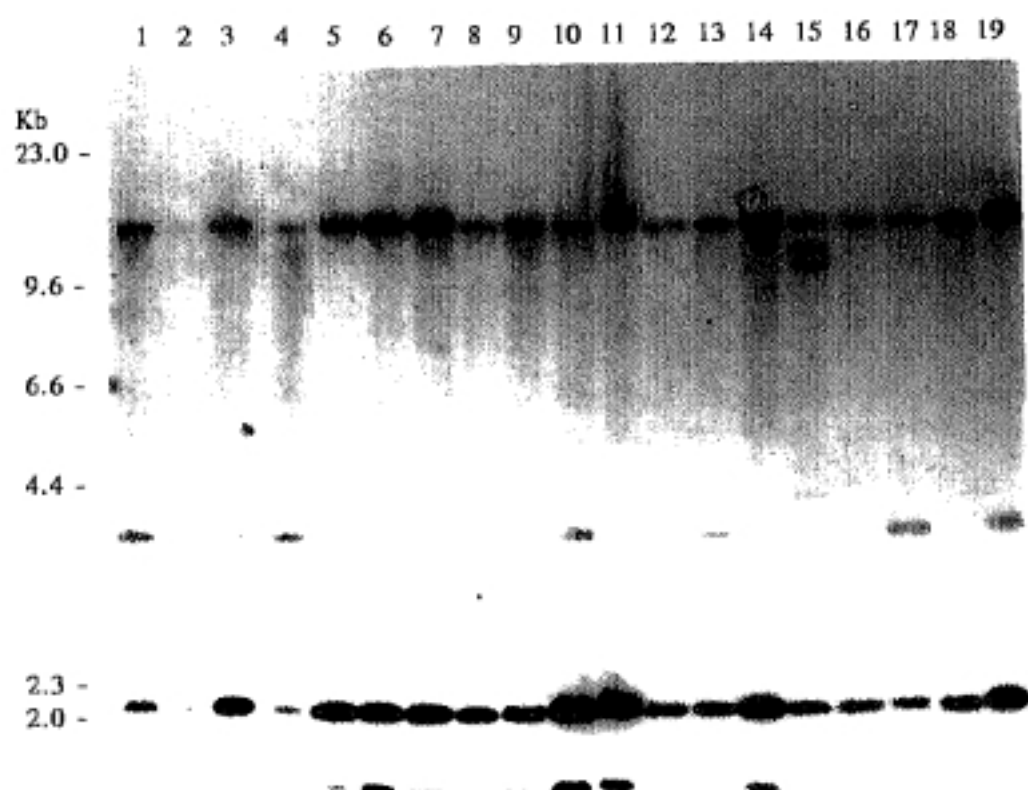


Figura 24.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pdK20 de los ADN_g digeridos con HindIII/BanHI. 1.- Espín; 2.- Garrido; 3.- Tejucar; 4.- Carrasco; 5.- Anastasio; 6.- Antúnez; 7.- Palma; 8.- Cuadros; 9.- Clemente; 10.- Natalio; 11.- Massa; 12.- Ribas; 13.- Estesó; 14.- Angel; 15.- Armenteros; 16.- LEM-425; 17.- LEM-356; 18.- LEM-307; 19.-BCN-65.

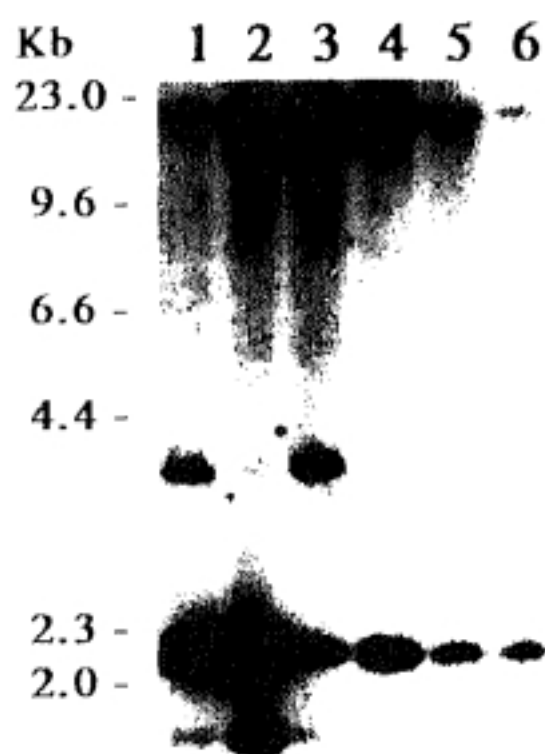


Figura 25.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pdK20 de los ADN_g digeridos con HindIII/BamHI. 1.- Javier; 2.- Zamora; 3.- Arenas; 4.- Seguí; 5.- Lang; 6.- Elena.

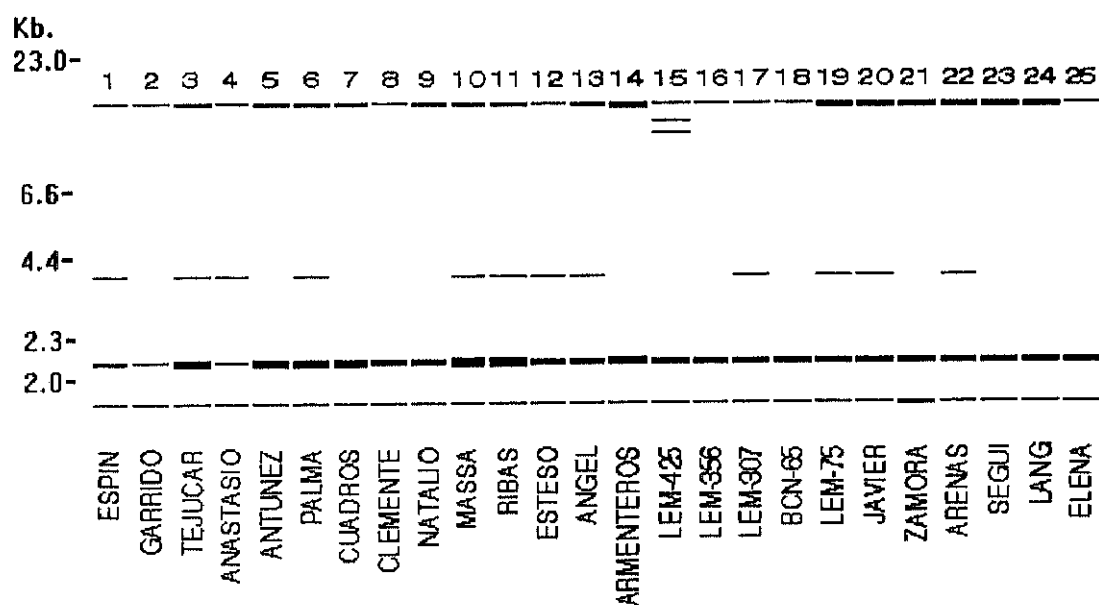


Figura 26.- Diagrama correspondiente al patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK20 (ver Figuras 24 y 25)

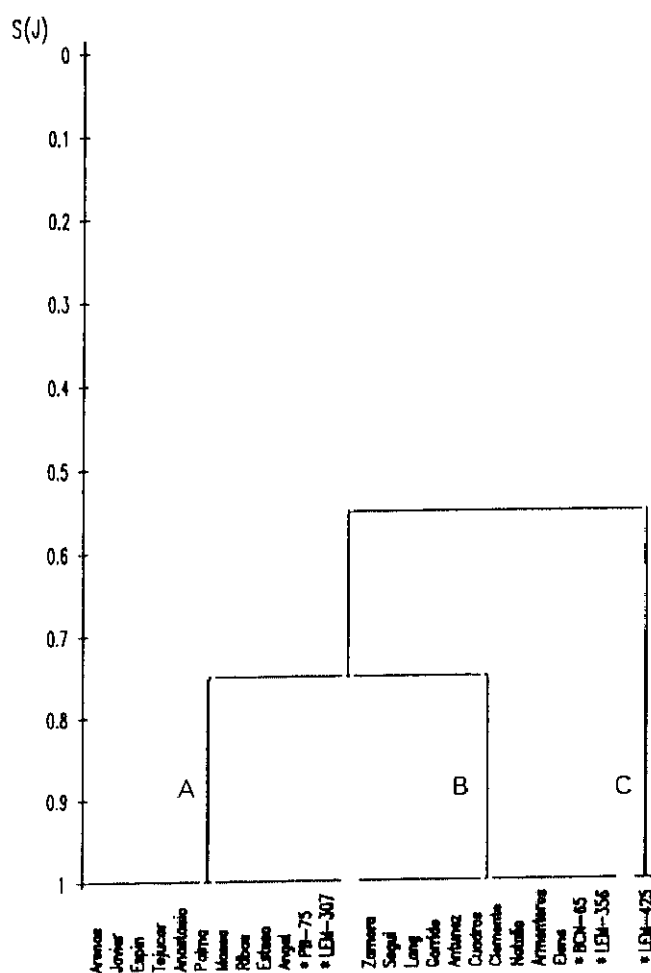


Figura 27.- Dendrograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del polimorfismo enzimático utilizando el programa de taxonomía TAXAN aplicando el índice de similitud de Jaccard $S(J)$.

4.4.- Caracterización del aislado ANA

El aislado denominado ANA (MHOM/ES/91/LLM-325) se obtuvo a partir de un aspirado de médula ósea practicado a una enferma ADVP y VIH+ (IVC-1) de Madrid. La caracterización enzimática de este aislado se inició junto con los otros aislados de *Leishmania* de sujetos según se describe en el apartado 3.2. de Material y Métodos. En los primeros geles que realizamos nos sorprendió la diferente movilidad que presentaba este aislado con cada sistema enzimático en relación a los diferentes marcadores utilizados y el resto de los aislados (Figura 28). Por tanto, decidimos tratar su caracterización mediante sondas de ADN y análisis enzimático en un capítulo aparte.

4.4.1.- Caracterización mediante sondas de ADN

4.4.1.1.- Caracterización con las sondas de ADN 7-059, pDK-20 y pDK-10

Las características de las sondas de ADN recombinante 7-059, pDK20 y pDK10, se detallan en el apartado 3.3.7. de Material y Métodos. La caracterización del aislado ANA mediante estas sondas se llevó a cabo según se explica en el mismo apartado de Material y Métodos. En el caso de las sondas 7-059 y pDK-10 los ADNs genómicos de todas las cepas de referencia utilizadas así como del aislado ANA y otras especies de tripanosomátidos se digirieron con el enzima de restricción Pst-1 y con HindIII/BamH1 en el caso de la sonda pDK20 (Material y Métodos 3.3.3.).

Caracterización inicial del aislado ANA con las sondas 7-059, pDK20 y pDK10

En la Figura 29 se muestra el patrón obtenido después de la hibridación con la sonda 7-059. Las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75, LEM-307 e IPT-1, así como el aislado de *L. (L.) infantum* Jiro y la cepa de referencia de *L. (L.) major* 5-ASKH, mostraron el patrón de hibridación característico con esta sonda, sin embargo no hubo hibridación cruzada del aislado ANA con esta sonda a pesar de una larga sobreexposición.

En la Figura 30 se muestra el resultado de la hibridación con la sonda pDK20. Como en el caso de la hibridación con la sonda 7-059, no se observó hibridación cruzada del aislado ANA con esta sonda. El patrón obtenido para las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75, LEM-307 e IPT-1 así como para el aislado Jiro y *L. (L.) major* 5-

ASKH, fue el esperado para esta sonda.

El resultado de la hibridación de los ADNg de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75, LEM-307 e IPT-1, del aislado Jiro, de la cepa de referencia de *L. (L.) major* 5-ASKH y el aislado ANA se muestra en la Figura 31. Tampoco hubo hibridación cruzada del aislado ANA con esta sonda.

Caracterización del aislado ANA y otros tripanosomátidos con las sondas 7-059, pDK20 y pDK10.

Con el objeto de estudiar el patrón de hibridación con otros tripanosomátidos, se realizó la hibridación con el ADNg del aislado ANA. Se utilizaron también las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75 y LEM-307, los aislados de *L. (L.) infantum* Arce, Natalio, Angel y Espín) y los tripanosomátidos *Crithidia fasciculata*, *Leptomonas ctenocephali*, *Herpetomonas muscarum* y *Endotrypanum schaudinni*. El resultado de la hibridación con la sonda 7-059 aparece en la Figura 32. Con todos los aislados y cepas de referencia de *L. (L.) infantum* se obtuvo el patrón característico, sin embargo, no hubo hibridación cruzada con el aislado ANA ni con otros tripanosomátidos. Los mismos resultados se obtuvieron con las sondas pDK20 (Figura 33) y pDK10 (Figura 34).

4.4.1.2.- Caracterización con la sonda de ADNk k-1/307

El ADNk del aislado ANA así como los ADNk de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* (LEM-307 y BCN-65) y de diferentes especies de tripanosomátidos: *C. fasciculata*, *E. schaudinni*, *L. ctenocephali* y *H. muscarum* se digirieron con el enzima de restricción Hae III (Material y Métodos 3.3.3.) se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron por capilaridad. La hibridación posterior con la sonda de ADNk k-1/307 se realizó según se explica en el apartado correspondiente (Material y Métodos 3.3.6.). Como se puede observar en la Figura 35, se obtuvo una fuerte señal de hibridación con las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-307 y BCN-65, pero no hubo hibridación cruzada con el aislado ANA ni con ninguna de las especies de tripanosomátidos.

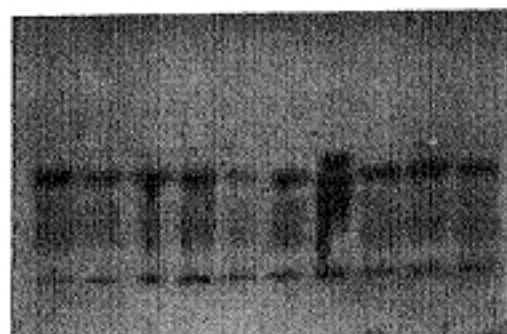
4.4.1.3.- Homología del ADNk y ADNg del aislado ANA con otras especies de *Leishmania* y otros tripanosomátidos

Con el fin establecer la homología entre el ADNk y ADNg del aislado ANA con el de otras especies de *Leishmania* y tripanosomátidos, 500 ng de ADNk y ADNg de ocho especies de *Leishmania* (*L. (L.) infantum* (LEM-75, LEM-307, IPT-1), *L. (L.) chagasi* (PP-75), *L. (L.) donovani* (DD8), *L. (L.) tropica* (K-27), *L. (L.) major* (LRC-137), *L. (L.) mexicana* (M-379) y *L. (L.) amazonensis* (PH-8)), de otros tripanosomátidos (*C. fasciculata*, *E. schaudinni*, *L. ctenocephali* y *H. muscarum* y del aislado ANA, se transfirieron por vacío ("Slot-blot") a filtros de nylon (Material y Métodos 3.3.5.2.) y se hibridaron con 25 ng de ADNk y ADNg del aislado ANA marcado con P^{32} según se explica en los apartados 3.3.6.2. y 3.3.7.2. de Material y Métodos.

El resultado correspondiente a la hibridación con el ADNk del aislado ANA marcado con P^{32} se muestra en la Figura 36. La autorradiografía obtenida después de 3h 30' de exposición (A) muestra una fuerte señal de hibridación con el ADNk homólogo. No hubo hibridación cruzada con el ADNk de ninguna de las especies de *Leishmania* ni con otros tripanosomátidos. Después de 24h de exposición (B) se observó una ligerísima señal de hibridación con el ADNk de *C. fasciculata* y *E. schaudinni*. No se apreció hibridación cruzada con el ADNk de ninguna de las especies de *Leishmania* y con los otros tripanosomátidos.

La Figura 37 recoge el resultado obtenido después de la hibridación con el ADNg del aislado ANA marcado con P^{32} . Después de 3h 30' de exposición (A) sólo se observó una fuerte señal de hibridación con el ADNg del aislado ANA. La autorradiografía obtenida a las 24h de exposición (B) muestra una ligera hibridación con todos los ADNg de *Leishmania* y tripanosomátidos que no fue comparable en ningún caso con la fuerte señal de hibridación obtenida con el aislado ANA.

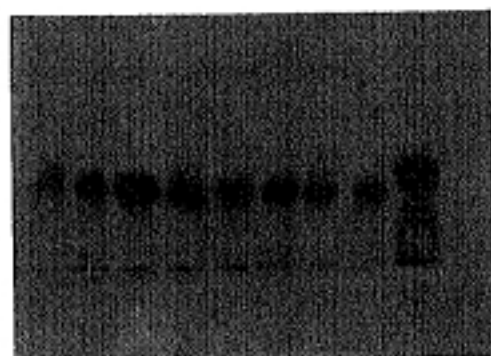
EM



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: LEM-307 (MON-29)
- 3: BCN-65 (MON-28)
- 4: LEM-356 (MON-33)
- 5: LEM-425 (MON-80)
- 6: LEM-75 (MON-1)
- 7: ANA
- 8: LEM-75 (MON-1)
- 9: Jiro (MAD-1)
- 10: LEM-75 (MON-1)

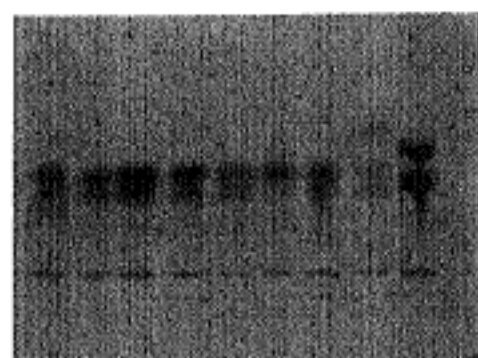
PGM



1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1: Natalio (MAD-29)
- 2: Ribas (MAD-1)
- 3: Esteso (MAD-1)
- 4: Elena (MAD-19)
- 5: Angel (MAD-33)
- 6: Massa (MAD-34)
- 7: Armenteros (MAD-24)
- 8: Jiro (MAD-1)
- 9: ANA

6PG



1 2 3 4 5 6 7 8 9

- 1: Natalio (MAD-29)
- 2: Ribas (MAD-1)
- 3: Esteso (MAD-1)
- 4: Elena (MAD-19)
- 5: Angel (MAD-33)
- 6: Massa (MAD-34)
- 7: Armenteros (MAD-24)
- 8: Jiro (MAD-1)
- 9: ANA

Figura 28.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos EM, PGM y 6PG.

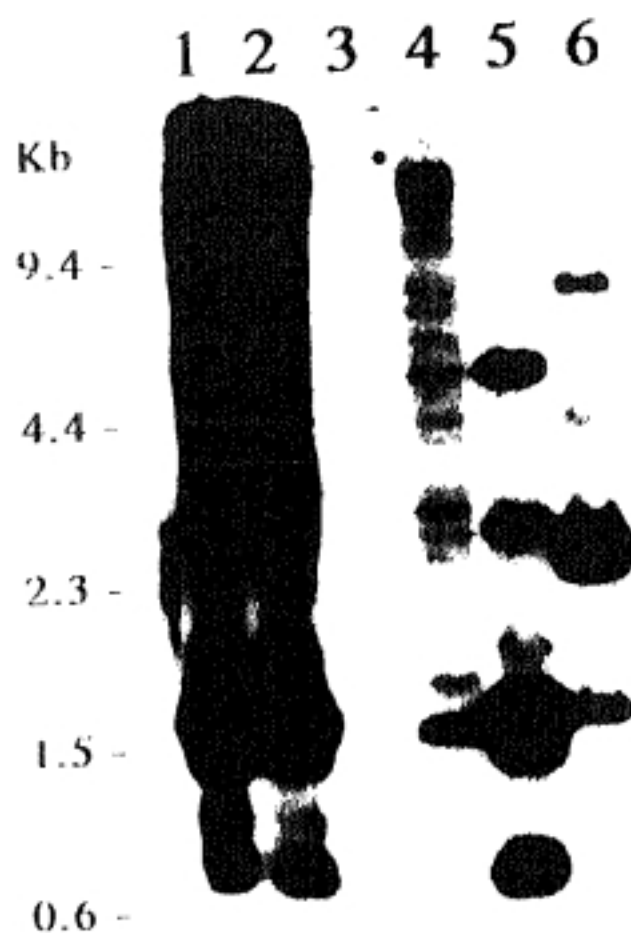


Figura 29.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059. 1.- LEM-75; 2.- LEM-307; 3.- ANA; 4.- Jiro; 5.- IPT-1; 6.- 5-ASKH.

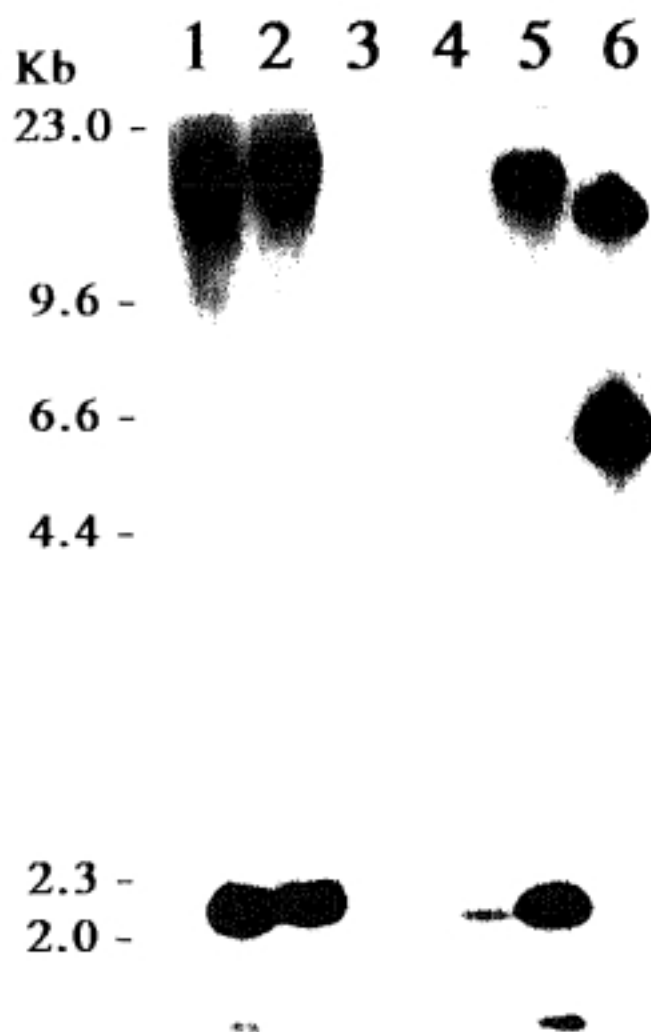


Figura 30.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK20. 1.- LEM-75; 2.- LEM-307; 3.- ANA; 4.- Jiro; 5.- IPT-1; 6.- 5-ASKH.

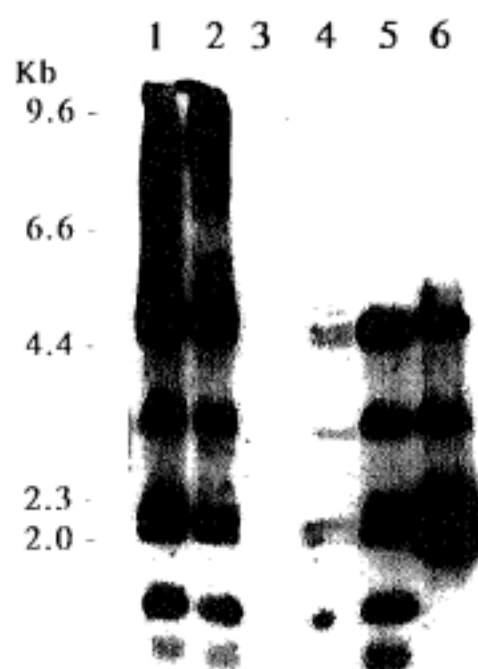


Figura 31.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK10. 1.- LEM-75; 2.- LEM-307; 3.- ANA; 4.- Jiro; 5.- IPT-1; 6.- 5-ASKH.

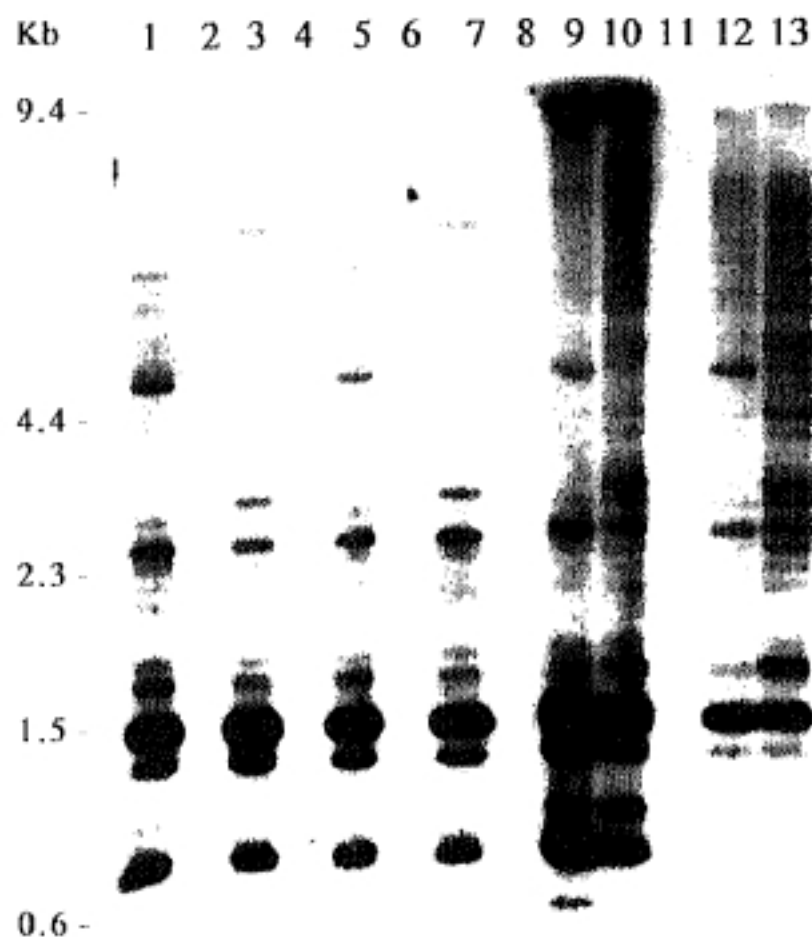


Figura 32.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059. (1) LEM-75, (2) *Crithidia fasciculata*, (3) LEM-307, (4) *Herpetomonas muscarum*, (5) LEM-75, (6) ANA, (7) LEM-307, (8) *Leptomonas ctenocephali*, (9) Arce, (10) Natalio, (11) *Endotrypanum schaudinni*, (12) Angel, (13) Espín.

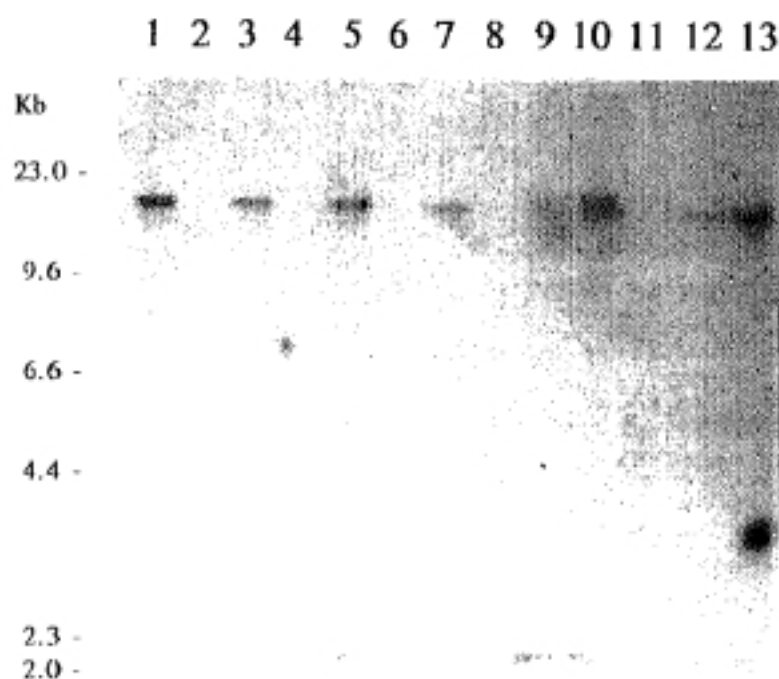


Figura 33.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK20. (1) LEM-75, (2) *Crithidia fasciculata*, (3) LEM-307, (4) *Herpetomonas muscarum*, (5) LEM- 75, (6) ANA, (7) LEM-307, (8) *Leptomonas ctenocephali*, (9) Arce, (10) Natalio, (11) *Endotrypanum schaudinni*, (12) Angel, (13) Espín.

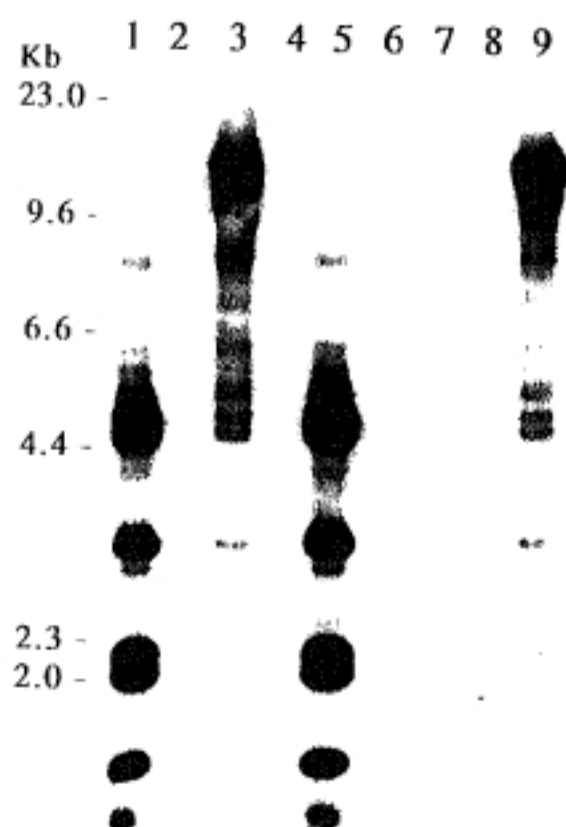


Figura 34.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK10. (1) LEM-75, (2) *Crithidia fasciculata*, (3) LEM-307, (4) *Herpetomonas muscarum*, (5) LEM-75, (6) ANA, (7) *Leptomonas ctenocephali*, (8) *Endotrypanum schaudinni*, (9) LEM-75.

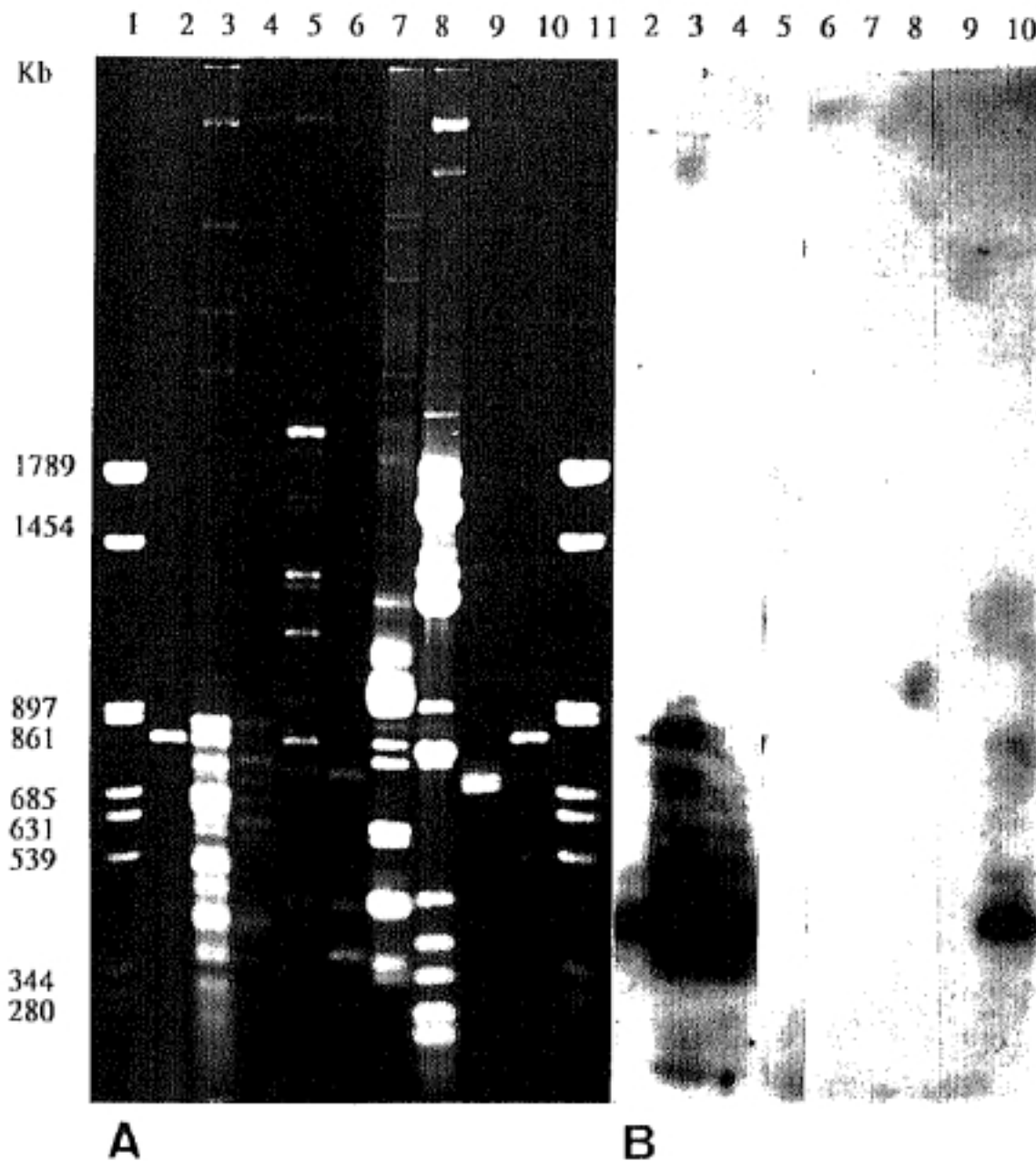


Figura 35.- A) Patrón obtenido al digerir los ADNk de *Leishmania* y otros tripanosomátidos con el enzima de restricción Hae III. 1.- ADN del bacteriófago PM2 digerido con HaeIII; 2.- LEM-307; 3.- BCN-65; 4.- LEM-356; 5.- *Crithidia fasciculata*; 6.- *Leptomonas ctenocephali*; 7.- ANA; 8.- *Herpetomonas muscarum*; 9.- *Endotrypanum schaudinni*; 10.- LEM-307. B) Autoradiografía del gel (A) transferido a nylon e hibridado con la sonda k-1/307. Las calles 2-9 son idénticas a las de A.

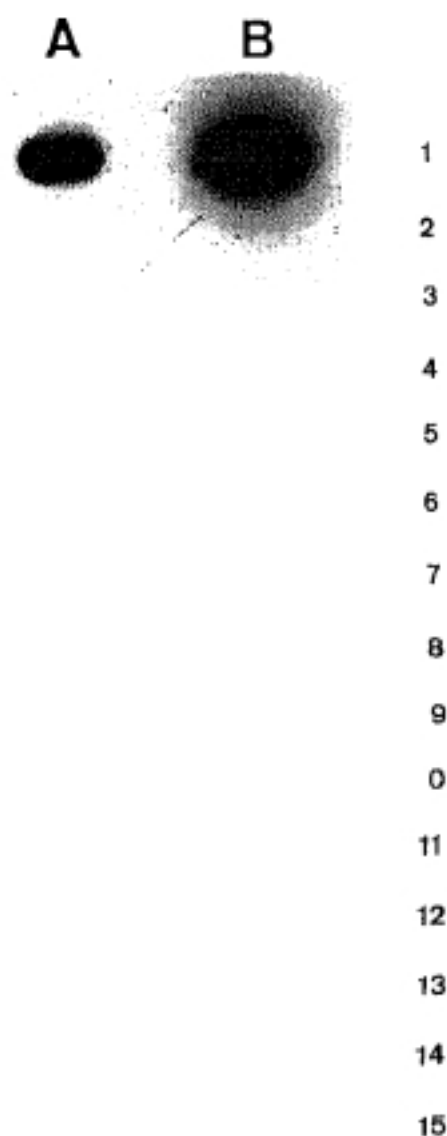


Figura 36.- Homología del ADNk del aislado ANA con otras especies de *Leishmania* y otros tripanosomátidos. A) Después de 3h 30' de exposición. B) Después de 24 h de exposición. (1) ANA, (2) *Crithidia fasciculata*, (3) *Herpetomonas muscarum*, (4) *Leptomonas ctenocephali*, (5) *Endotrypanum schaudinni*, (6) LEM-75. (7) LEM-307, (8) IPT-1, (9) PP-75, (10) DD8, (11) PH8, (12) M-379, (13) K-27, (14) LRC-137, (15) 5-ASKH.

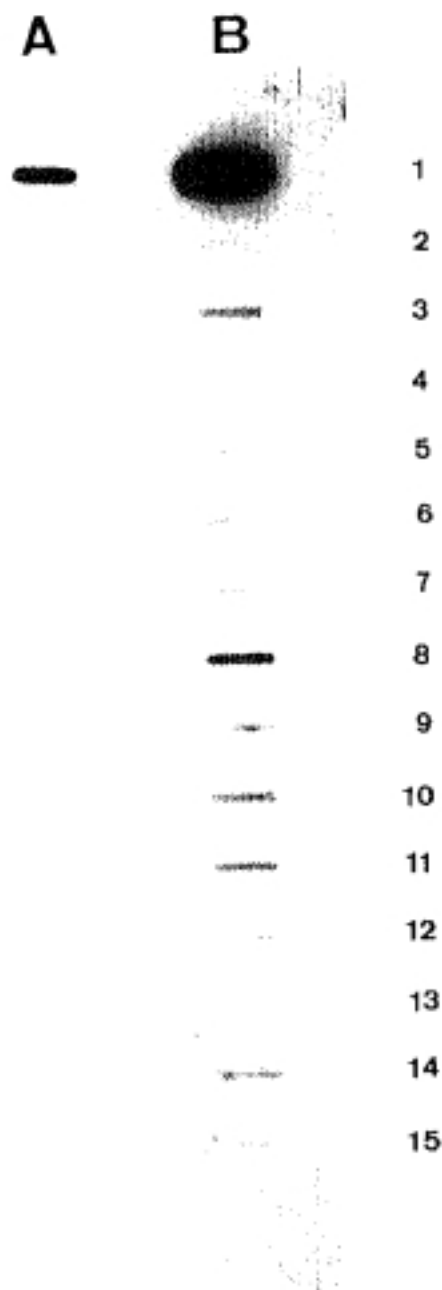


Figura 37.- Homología del ADNg del aislado ANA con otras especies de *Leishmania* y otros tripanosomátidos. A) Después de 3h 30' de exposición. B) Después de 24 h de exposición. (1) ANA, (2) *Crithidia fasciculata*, (3) *Herpetomonas muscarum*, (4) *Leptomonas ctenocephali*, (5) *Endotrypanum schaudinni*, (6) LEM-75. (7) LEM-307, (8) IPT-1, (9) PP-75, (10) DD8, (11) PH8, (12) M-379, (13) K-27, (14) LRC-137, (15) M-1176.

4.4.2.- Caracterización enzimática

Con el fin de establecer de manera más precisa la identidad del aislado ANA realizamos su caracterización enzimática mismo mediante 15 sistemas enzimáticos, según se explica en el apartado 3.2. de Material y Métodos. Los perfiles enzimáticos obtenidos para el aislado ANA se compararon con los obtenidos para la cepa de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75 y con las otras especies de tripanosómátidos: *C. fasciculata*, *H. muscarum*, *L. ctenocephali*, *E. schaudinni* y *S. tarentolae*.

En la Tabla 25 aparecen los valores de cada uno de los electromorfos obtenidos con cada sistema enzimático para el aislado ANA, la cepa de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75 y otras especies de tripanosomátidos. Como se puede observar en la Tabla 25 y en las Figuras 38, 39, 40, 41, 42 el aislado ANA presentó electromorfos con valores muy diferentes de los obtenidos con la cepa de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75. Así mismo, ninguna de las especies de tripanosomátidos utilizadas en el estudio mostró un patrón isoenzimático igual al del aislado ANA.

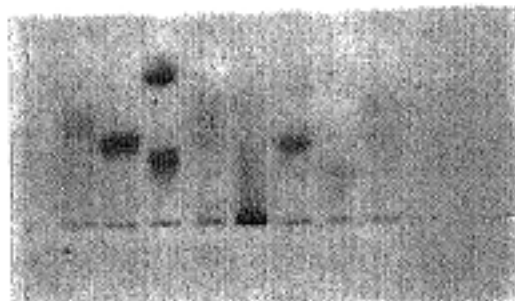
En la Figura 43 se muestra el dendograma construido a partir de la matriz de similaridad obtenida con los datos del polimorfismo enzimático mediante el programa de taxonomía numérica TAXAN aplicando el coeficiente de similaridad de Jaccard S(J) (Material y Métodos 3.5.1.). Del análisis de agrupamiento se puede observar que existe una mayor proximidad filogenética entre *L. (L.) infantum* y *S. tarentolae* (0'286) que con *L. ctenocephali* (0'143) y *H. muscarum* (0'071). No existe ningún grado de similaridad entre *L. (L.) infantum* y *C. fasciculata*, *E. schaudinni* y el aislado ANA. Así mismo, no existe ninguna proximidad filogenética entre el aislado ANA, *L. (L.) infantum* y los tripanosomátidos estudiados (0'000). Dentro de los tripanosomátidos la mayor proximidad filogenética se obtuvo entre *C. fasciculata* y *H. muscarum* (0'357).

Tabla 25.- Perfil enzimático obtenido para la cepa de referencia de Leishmania LEM-75, el aislado ANA y otros tripanosomátidos.

CEPA DE REFERENCIA	ENZIMAS ESTUDIADOS														
	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	SOD	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
OTROS TRIPANOSOMATIDOS															
<u>Crithidia fasciculata</u>	150	66	25/75/150	76/105	76	125	37	500	166	45	80	100/250	90	88	-
<u>Herpetomonas muscarum</u>	150	73	25	80/105	70	112	37	600	93/200	45	227	100/250	100	88	-
<u>Leptomonas ctenocephali</u>	160	83	125	95	80	120	100	X	46	X	110	X	100	X	-
<u>Endotrypanum shaudinni</u>	62	33/100	55	14/76	40	130	50	720	133/213	94	115	30	81	64	-
<u>Sauroleishmania tarentolae</u>	140	100	55/125/200	119	95	160	75	600	133	20/35	113/163	100	100	100	-
AISLADO ANA	220	100/123	50/105/150	95/128	61/128	87	62	840	80	20	55/95	20	30/100/135	60	-

X: ausencia de banda

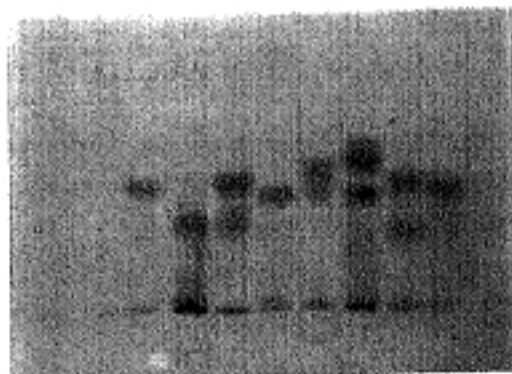
G6P



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Crithidia fasciculata*
- 3: Ana
- 4: *Sauroleishmania tarentolae*
- 5: *Leptomonas ctenocephali*
- 6: *Herpetomonas muscarum*
- 7: *Endotrypanum schaudinni*
- 8: LEM-75 (MON-1)

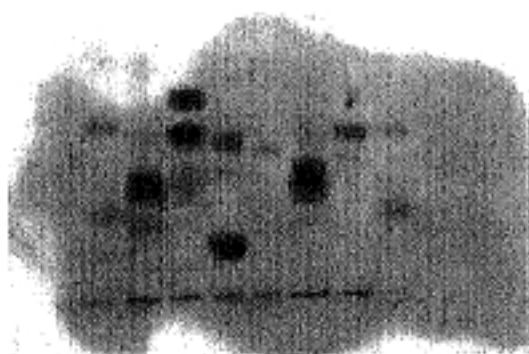
6PG



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Endotrypanum schaudinni*
- 3: *Herpetomonas muscarum*
- 4: *Leptomonas ctenocephali*
- 5: *Sauroleishmania tarentolae*
- 6: Ana
- 7: *Crithidia fasciculata*
- 8: LEM-75 (MON-1)

EM



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Crithidia fasciculata*
- 3: Ana
- 4: *Endotrypanum schaudinni*
- 5: *Leptomonas ctenocephali*
- 6: *Herpetomonas muscarum*
- 7: *Sauroleishmania tarentolae*
- 8: LEM-75 (MON-1)

Figura 38.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos G6P, 6PG y EM.

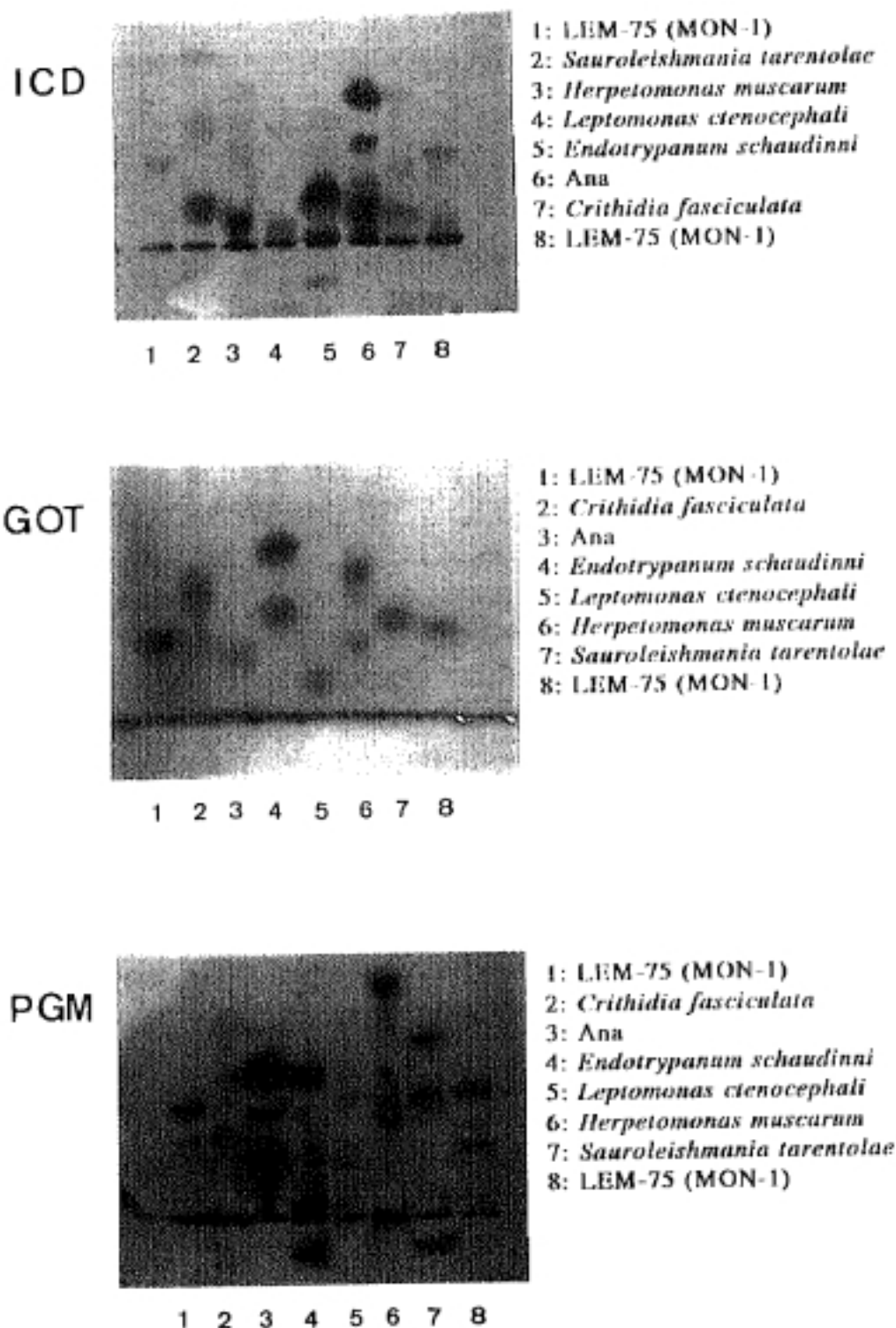
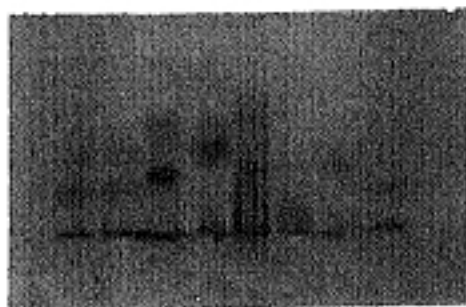


Figura 39.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos ICD, GOT y PGM.

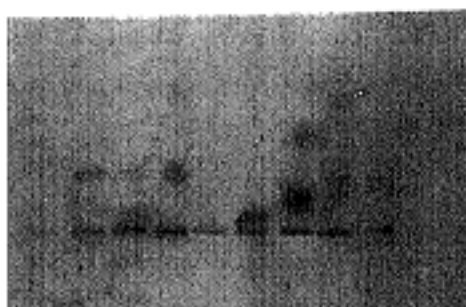
MDH



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: LEM-75 (MON-1)
- 3: *Crithidia fasciculata*
- 4: Ana
- 5: *Herpetomonas muscarum*
- 6: *Endotrypanum schaudinni*
- 7: *Leptomonas ctenocephali*
- 8: LEM-75 (MON-1)

FH



1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Sauroleishmania tarentolae*
- 3: *Herpetomonas muscarum*
- 4: *Leptomonas ctenocephali*
- 5: *Endotrypanum schaudinni*
- 6: Ana
- 7: *Crithidia fasciculata*
- 8: LEM-75 (MON-1)

DIA

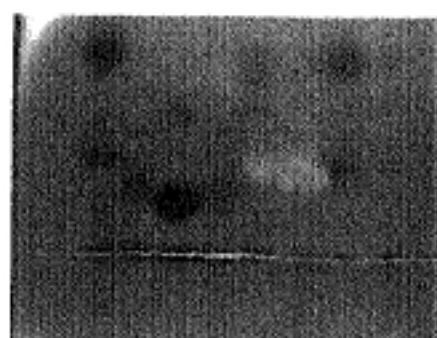


1 2 3 4 5 6 7 8

- 1: LEM-75 (MON-1)
- 7: *Endotrypanum schaudinni*
- 6: *Leptomonas ctenocephali*
- 5: *Herpetomonas muscarum*
- 4: *Sauroleishmania tarentolae*
- 2: *Crithidia fasciculata*
- 3: Ana
- 8: LEM-75 (MON-1)

Figura 40.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos MDH, FH y DIA.

MPI



- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Crithidia fasciculata*
- 3: Ana
- 4: *Herpetomonas muscarum*
- 5: *Endotrypanum schaudinni*
- 6: *Leptomonas ctenocephali*
- 7: LEM-75 (MON-1)

1 2 3 4 5 6 7

NP



- 1: LEM-75 (MON-1)
- 2: *Crithidia fasciculata*
- 3: Ana
- 4: *Sauroleishmania tarentolae*
- 5: *Leptomonas ctenocephali*
- 6: *Herpetomonas muscarum*
- 7: *Endotrypanum schaudinni*
- 8: LEM-75 (MON-1)

1 2 3 4 5 6 7 8

GPI



- 1: *Crithidia fasciculata*
- 2: Ana
- 3: *Sauroleishmania tarentolae*
- 4: *Leptomonas ctenocephali*
- 5: *Herpetomonas muscarum*
- 6: *Endotrypanum schaudinni*
- 7: LEM-75 (MON-1)

1 2 3 4 5 6 7

Figura 41.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos MPI, NP y GPI.

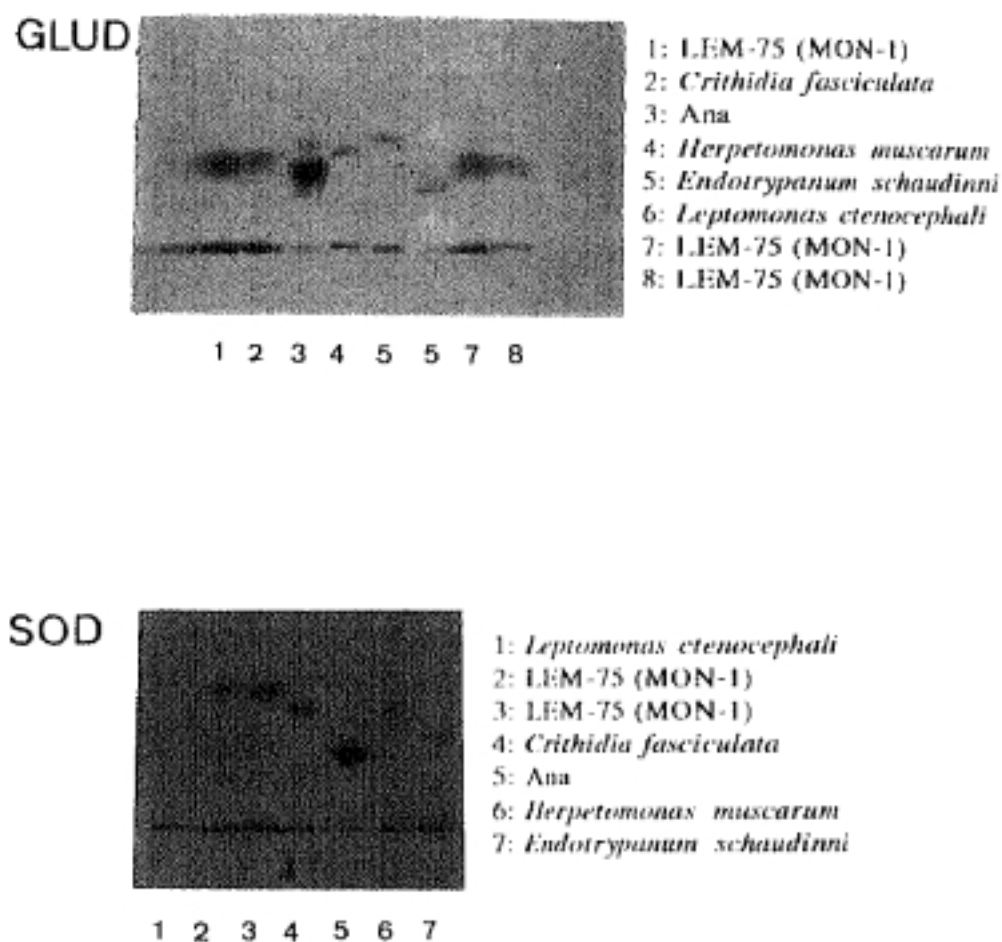


Figura 42.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos GLUD y SOD.

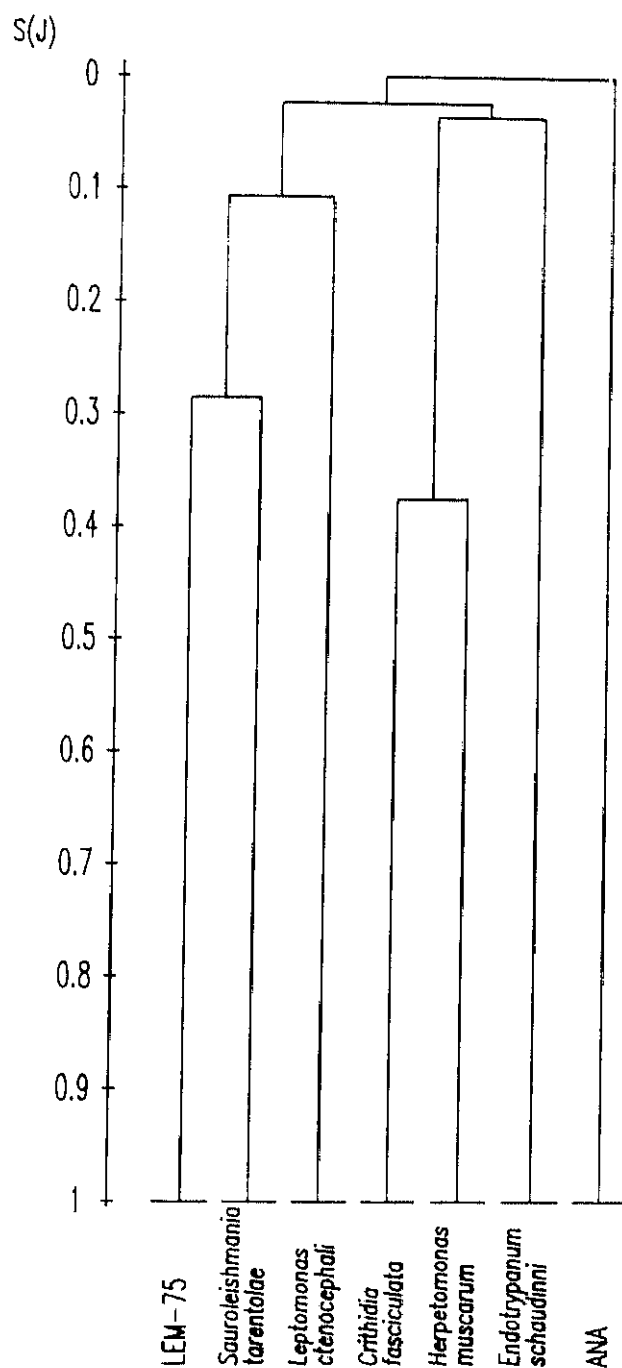


Figura 43.- Dendrograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del polimorfismo enzimático utilizando el programa de taxonomía TAXAN y aplicando el índice de similaridad de Jaccard $S(J)$.

4.5.- Caracterización del aislado humano de ANGOLA

Se ha realizado la caracterización de un aislado de *Leishmania*, PAULO (MHOM/AO/91/LLM-85), de un sujeto de 26 años de edad de Angola, sin historial previo o antecedentes de haber trabajado fuera de este país y que llevaba residiendo en España tres meses, tiempo insuficiente para presentar una esplenomegalia que alcanzaba la fosa ilíaca derecha. Los parásitos se aislaron en medio NNN a partir de médula ósea y fueron caracterizados mediante sondas de ADN y análisis enzimático.

4.5.1.- Caracterización mediante sondas de ADN

4.5.1.1.- Caracterización con la sonda de ADNk k-1/307

El ADNk del aislado PAULO así como los ADNk de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* (LEM-75, LEM-307, IPT-1) y de diferentes especies del Viejo Mundo (5-ASKH, LRC-133, LRC-32) se digirieron con el enzima de restricción Hae III (Material y Métodos 3.3.3.) se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa y se transfirieron por capilaridad. La hibridación posterior con la sonda de ADNk se realizó según se explica en el apartado correspondiente (Material y Métodos 3.3.6.). Cuando el ADNk del aislado PAULO fue caracterizado con la sonda de ADNK k-1/307, se obtuvo una fuerte señal de hibridación, similar a la obtenida con las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* (LEM-307, IPT-1 y LEM-75) y *L. (L.) donovani s.s* (LRC-133) (Figura 44). Estos datos confirman la relación entre el aislado PAULO con *L. (L.) donovani s.l.*. No se observó hibridación cruzada del aislado PAULO con *L. (L.) tropica* (LRC-32).

4.5.1.2.- Caracterización con las sondas de ADNg 7-059, pDK20 y pDK10

Para la caracterización de este aislado se utilizaron tres sondas de ADN recombinante: 7-059, pDK20 y pDK10, cuyas características se detallan en el apartado 3.3.7. de Material y Métodos. La caracterización mediante estas sondas se llevó a cabo según se explica en el mismo apartado de Material y Métodos. En el caso de las sondas 7-059 y pDK-10 los ADNs genómicos de todas las cepas de referencia utilizadas así como del aislado PAULO se digirieron con el enzima de restricción Pst-1 y con HindIII/BamHI en el caso de la sonda pDK20 (Material y Métodos 3.3.3.).

El patrón de hibridación obtenido para el aislado PAULO con cada una de las sondas se comparó con los obtenidos con las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75 e IPT-1 (MON-1) y de especies del Viejo Mundo: *L. (L.) donovani* (LRC-133), *L. (L.) tropica* (LRC-32) y *L. (L.) major* (5-ASKH). En el caso de la sonda pDK20 también se utilizó la cepa de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-425 (MON-80).

Caracterización con la sonda 7-059

Los resultados obtenidos con la sonda 7-059 se muestran en la Figura 45. El aislado PAULO presentó el mismo patrón que los marcadores de *L. (L.) donovani* s.l. (*L. (L.) infantum* (IPT-1, LEM-75) y *L. (L.) donovani* s.s (LRC-133)), pero diferente de *L. (L.) major* (5-ASKH) y *L. (L.) tropica* (LRC-32). Las bandas de 6.3, 3.0, 1.6, 1.4 y 0.8 Kb son específicas para las especies de *Leishmania* que causan LV (Van Eys *et al.*, 1989).

Caracterización con la sonda pDK20

El patrón obtenido después de la hibridación del ADN_g del aislado PAULO, con la sonda pDK20 (Figura 46), está relacionado con el obtenido para las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-75, IPT-1 (MON-1) y LEM-425 (MON-80) y no con el de *L. (L.) donovani* (LRC-133). El aislado PAULO presentó el fragmento de 18 Kb característico de *L. (L.) infantum* que no presenta *L. (L.) donovani* (Van Eys *et al.*, 1991).

Caracterización con la sonda pDK10

En la Figura 47 se muestra el resultado de la hibridación del ADN_g del aislado Paulo con la sonda pDK10. El aislado PAULO presentó el mismo patrón que las cepas de referencia de *L. (L.) infantum*, claramente diferente del de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) donovani*.

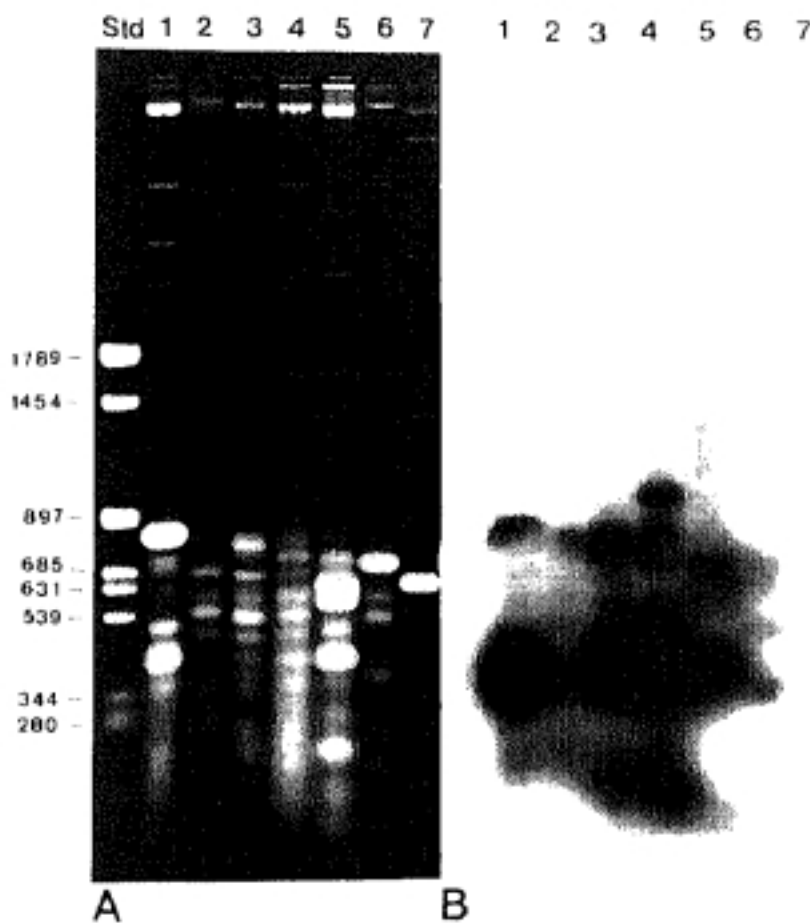


Figura 44.- A) Patrón obtenido al digerir los ADNk de *Leishmania* con el enzima de restricción Hae III. (Std) marcador de peso molecular, ADN del bacteriófago PM2 digerido con HaeIII; 1.- LEM-307; 2.- 5-ASKH; 3.- IPT-1; 4.- Paulo; 5. LEM-75; 6.- LRC-133; 7.- LRC-32. B) Autoradiografía del gel (A) transferido a nylon e hibridado con la sonda k-1/307. Las calles 1-7 son idénticas a las de A.

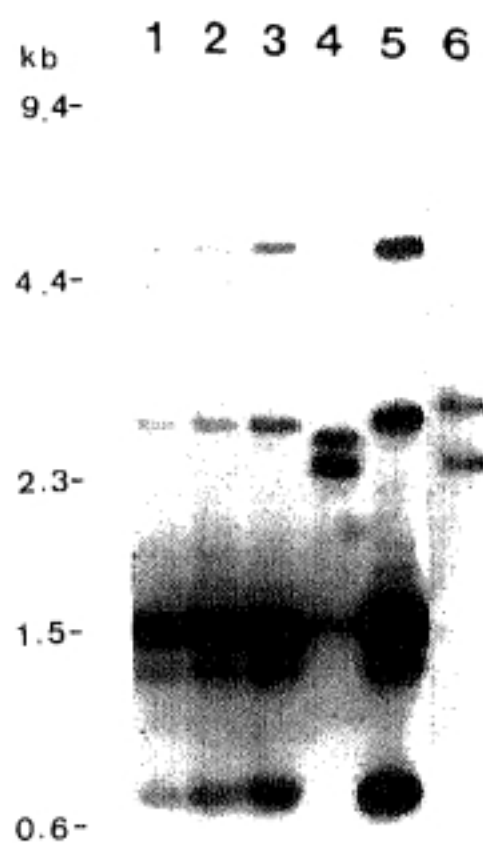


Figura 45.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda 7-059. 1.- IPT-1, 2.- Paulo; 3.- LEM-75; 4.- 5-ASKH; 5.- LRC-133; 6.- LRC-32.

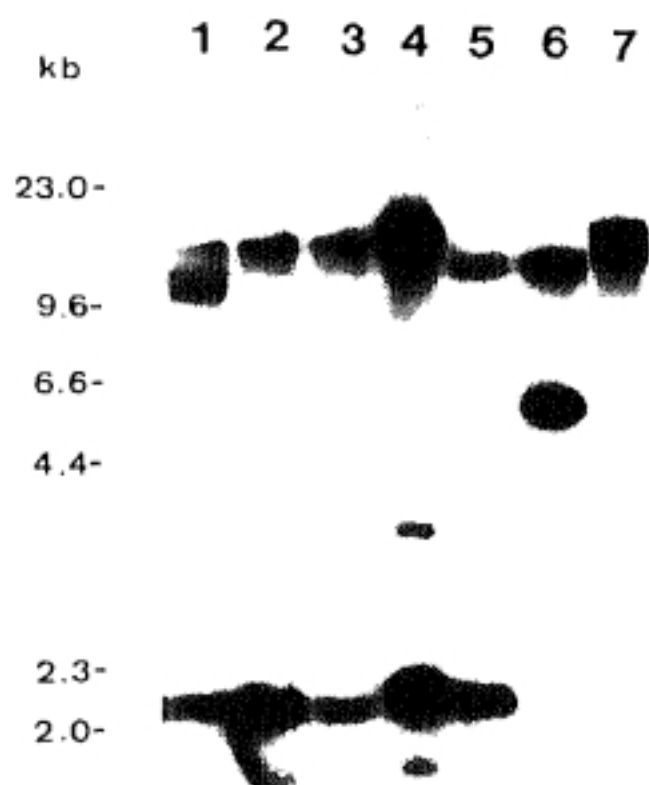


Figura 46.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK20. 1.- LEM-425, 2.- LEM-75; 3.- IPT-1, 4.- Paulo; 5.- LRC-133; 6.- 5-ASKH; 7.- LRC-32.

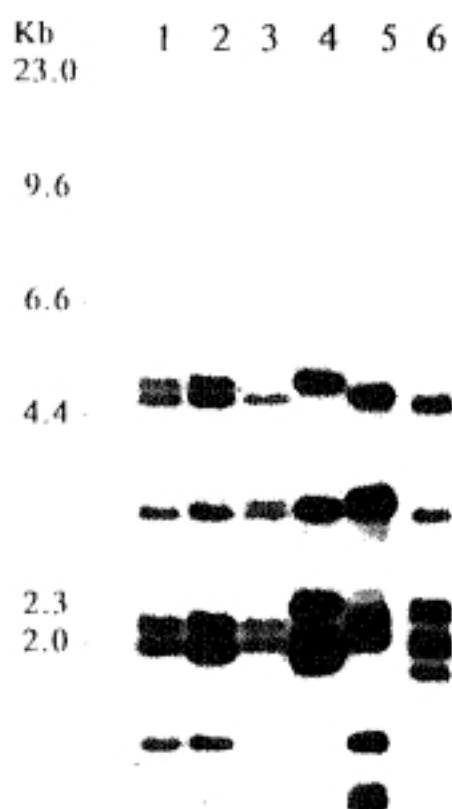


Figura 47.- Patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK10. 1.- Paulo; 2.- LEM-75; 3.- LRC-133; 4.- S-ASKH; 5.- LRC-133; 6.- LRC-32.

4.5.2.- Caracterización enzimática

El análisis enzimático se realizó mediante 14 sistemas enzimáticos y 15 loci como se indica en el apartado 3.2. correspondiente a Material y Métodos. Los perfiles enzimáticos obtenidos para el aislado Paulo, con los diferentes sistemas enzimáticos, se compararon con los obtenidos para las cepas de referencia de diferentes zimodemas de *L. (L.) infantum*, presentes en España (LEM-75, LEM-356 y LEM-307), así como con los obtenidos para las cepas de referencia de leishmanias del Viejo Mundo (IPT-1, 5-ASKH, LRC-147, K-27, LRC-32 y LRC-133).

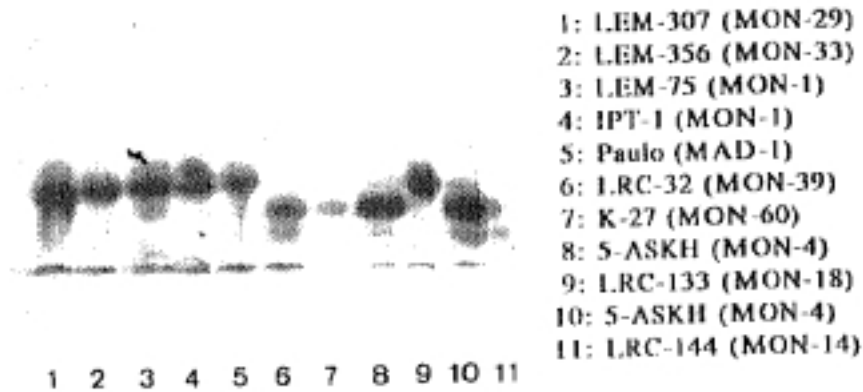
Este aislado presentó electromorfos con los mismos valores para todos los sistemas enzimáticos que las cepas de referencia de *L. (L.) infantum*, LEM-75 e IPT-1 (MON-1), pero diferentes a los presentados por otras especies, por lo que quedó caracterizado como *L. (L.) infantum*, zimodema MAD-1. En la Tabla 26 se muestra el valor de los electromorfos obtenidos con cada uno de los sistemas enzimáticos utilizados. En la Figura 48 aparecen los electromorfos obtenidos con los sistemas enzimáticos, GPI, GOT. El patrón obtenido para el sistema enzimático GPI separó este aislado de *L. (L.) tropica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) aethiopica* pero no de *L. (L.) donovani*. El electromorfo GOT₁₁₃ permitió diferenciar este aislado no sólo de *L. (L.) aethiopica*, *L. (L.) major* y *L. (L.) tropica* sino además de *L. (L.) donovani*. En la Figura 49 se muestra el patrón obtenido con los sistemas enzimáticos G6P, 6PG y MDH/EM para el aislado Paulo y las diferentes cepas de referencia. La movilidad del aislado Paulo para la G6P difiere de la de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* LEM-356 (MON-33) y LEM-307 (MON-29) y es equiparable a la de las cepas de referencia de *L. (L.) infantum* IPT-1 y LEM-75 (MON-1).

Los datos del polimorfismo enzimático fueron analizados con el programa de taxonomía numérica TAXAN, aplicando el índice de similaridad de Jaccard S(J) (apartado 3.5.1. de Material y Métodos). El dendograma construido a partir de la matriz de similaridad con los datos del polimorfismo enzimático aparece en la Figura 50. En este dendograma se observan tres ramas claramente individualizadas que separan las especies incluidas dentro de los complejos de *L. major*, *L. aethiopica* y *L. tropica* de los complejos de *L. donovani* y *L. infantum*, entre los que existe una mayor proximidad filogenética.

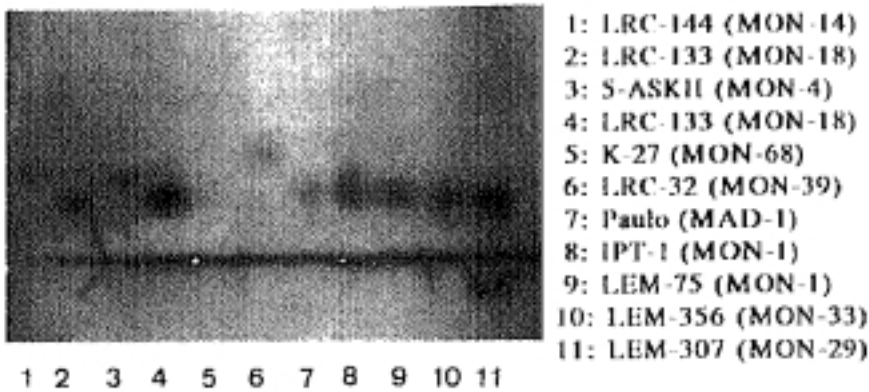
Tabla 26.- Perfiles enzimáticos obtenidos para las cepas de referencia de Leishmania del Viejo Mundo, cepas de referencia de L. (L.) infantum y aislado de Angola.

ENZIMAS ESTUDIADOS															
CEPAS DE REFERENCIA	MDH	EM	ICD	6PG	G6P	GLUD	DIA	NP1	NP2	GOT	MPI	PGM	FH	GPI	ZM
LEM-75	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307	104	100	100	100	105	100	100	140	100	100	100	100	100	100	29
LEM-356	104	100	100	100	105	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
IPT-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
5-ASKH	160	88	90	122	94	200	100	400	90	110	150	118	79	77	4
LRC-147	130	108	100	140	82	100	100	700	120	127	105	123	105	53	14
K-27	112	100	100	93	82	95	100	450	100	135	100	108	100	76	60
LRC-32	100	95	100	95	82	95	100	450	90	135	101	100	100	76	39
LRC-133	112	100	100	100	100	100	100	140	100	113	100	100	100	100	18
AISLADO DE ANGOLA															
LV e INMUNOCOMPETENTE (MEDULA)															
PAULO	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1

GPI



GOT



GOT

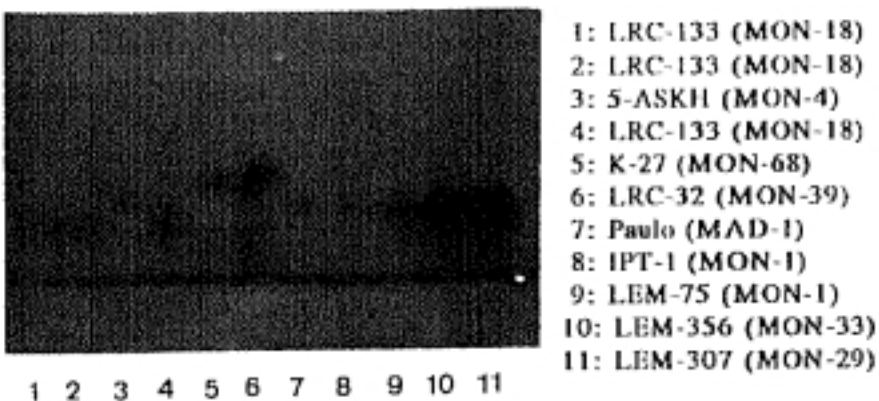


Figura 48.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos GPI y GOT.

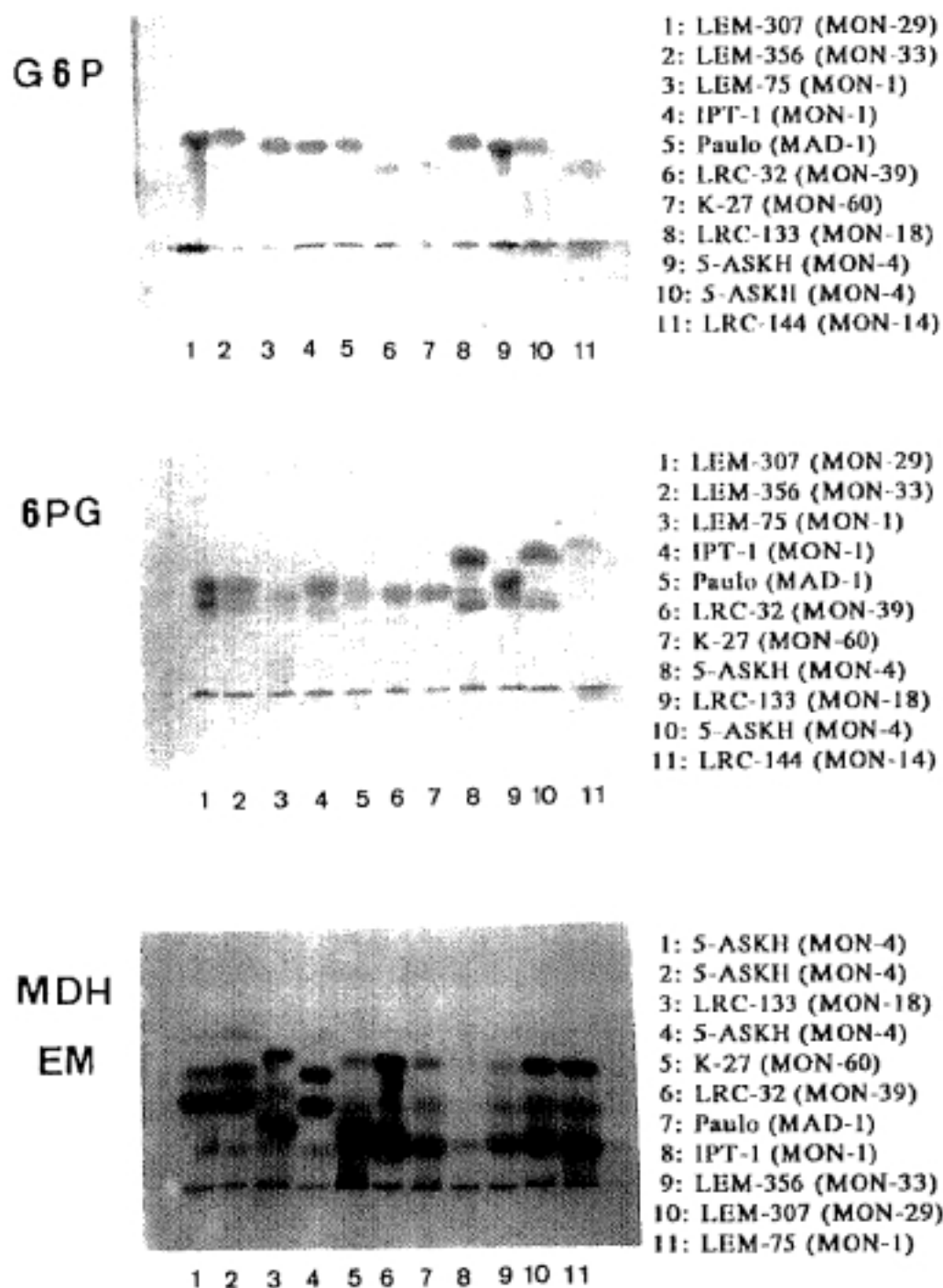


Figura 49.- Electromorfos obtenidos para los sistemas enzimáticos G6P, 6PG, MDH y EM.

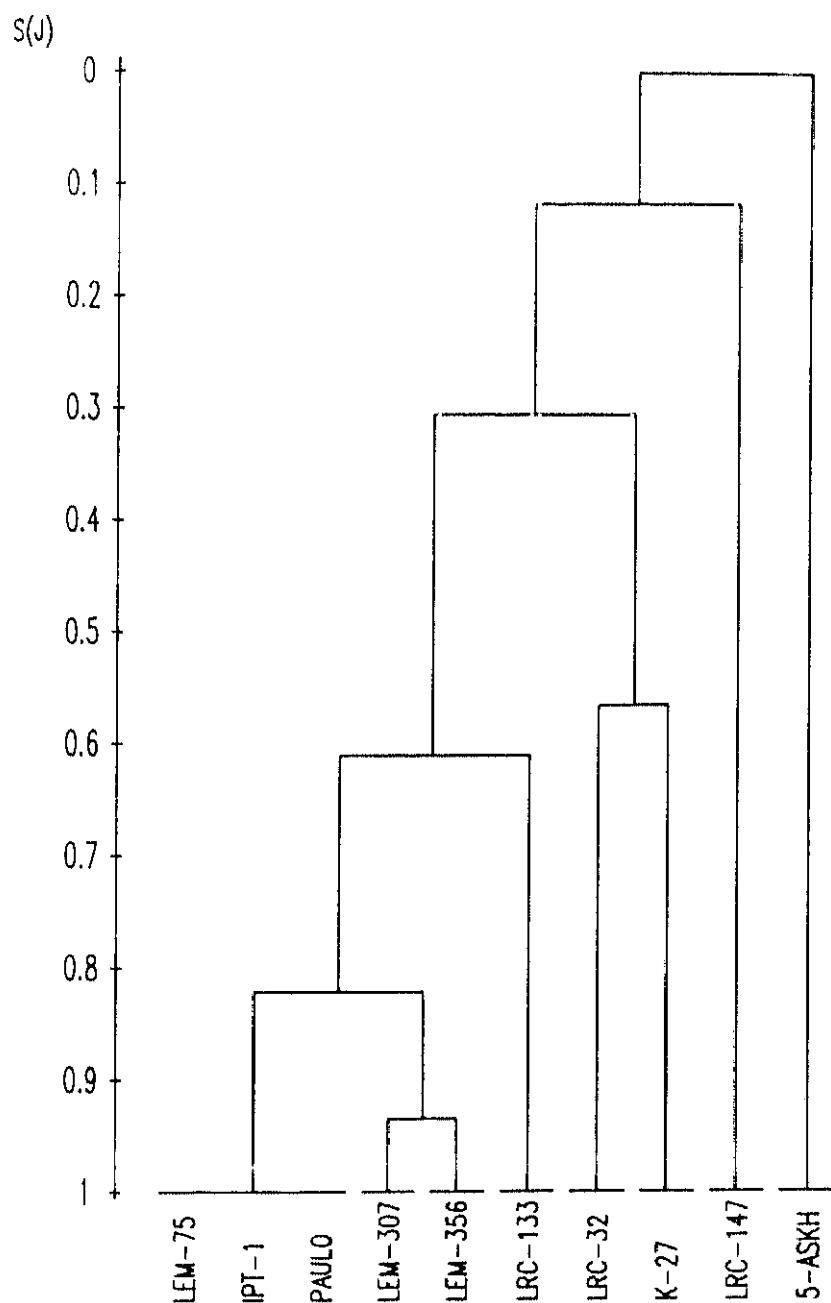


Figura 50.- Dendrograma construido a partir de la matriz de distancia generada con los datos del polimorfismo enzimático utilizando el programa de taxonomía numérica TAXAN y aplicando el índice de similitud de Jaccard $S(J)$.

DISCUSIÓN

5.- DISCUSIÓN

5.1.- Caracterización enzimática

Los 31 aislados caninos caracterizados en este trabajo han resultado ser *L. (L.) infantum* MAD-1 (Tabla 17). En la región Mediterránea el perro es el principal reservorio de *L. (L.) infantum*. En España se calcula que entre el 3% y 5% de los perros son seropositivos (Ministerio de Sanidad, Programa Nacional de Control de Leishmaniosis, datos no publicados). Los trabajos de caracterización de aislados caninos llevados a cabo en España hasta hace muy poco tiempo, sólo habían puesto de manifiesto la presencia del zimodema 1 (Lanotte *et al.*, 1981; Portús *et al.*, 1986; Alvar y Ortiz, 1987; Alvar, 1988). Recientemente se ha aislado el zimodema MON-77 de ganglio poplíteo en 6 perros y en dos ocasiones también de lesiones cutáneas (Gállego *et al.*, 1993) y MON-105 se ha encontrado en lesiones cutáneas de un perro en la provincia de Granada (Martin *et al.*, 1994). MON-77 se ha aislado también de médula ósea en un niño de dos años, de *Phlebotomus perniciosus* (Gállego *et al.*, 1993) y en un caso de coinfección *Leishmania*-VIH (Pratlong *et al.*, 1994) y MON-105 se ha podido aislar de *Phlebotomus perniciosus* (Martin *et al.*, 1992). Otros zimodemas, además de MON-1, pero en menor proporción como MON-72, MON-77 y MON-98 se han descrito en aislados caninos en países de la cuenca Mediterránea. El zimodema MON-72 se ha aislado en cuatro ocasiones de ganglio poplíteo de perros en Nápoles, Italia. Este zimodema se encuentra asociado al zimodema MON-1 en la misma especie de hospedador (perro y humano) provocando aparentemente la misma sintomatología (Gramiccia *et al.*, 1992c). Una situación similar ha sido descrita en El Agamy, Egipto donde el zimodema MON-98 ha sido descrito tanto en aislados caninos como humanos (Youssef *et al.*, 1989; Shetata *et al.*, 1990).

Existe en la literatura un caso de leishmaniosis en un perro de la región del Priorato, Tarragona que fue debida a la presencia simultánea de dos zimodemas MON-1 y MON-77 en piel y ganglios poplíteos (Pratlong *et al.*, 1989a). En nuestro caso no fue así y se obtuvo el mismo zimodema (MAD-1) de tres perros, Doberman, Belga y Perdiguero, en que las leishmanias se aislaron de médula ósea y también de sangre mediante xenodiagnóstico (Molina *et al.*, 1994b) se obtuvo el mismo zimodema. Tampoco encontramos diferentes zimodemas en aislados de piel, monocitos de sangre periférica o ganglio poplíteo obtenidos del mismo perro (aislados 30 y 37).

El análisis enzimático de 52 aislados humanos de *Leishmania*, 44 de sujetos

VIH+, 7 de sujetos inmunocompetentes y un aislado de un transplantado renal, nos ha permitido establecer la variabilidad que presenta *L. (L.) infantum* en España. Sorprendentemente, hemos encontrado ocho zimodemas diferentes: MAD-1, MAD-24, MAD-28, MAD-29, MAD-34, MAD-183 y MAD-501 en el total de aislados caracterizados (ver Tablas 19, 20, 21 y 22). El zimodema MAD-1 ha sido el mayoritario y estuvo presente en 22 ocasiones. Hay que tener en cuenta que este zimodema es el más ampliamente distribuido en los países de la Cuenca Mediterránea, y es responsable del 90% de las LV en sujetos inmunocompetentes y también aparece en LC. Este zimodema ha sido descrito previamente en la asociación *Leishmania*-VIH en España (Alvar *et al.*, 1987; Portús *et al.*, 1989), Francia (Bernard *et al.*, 1988; Marty *et al.*, 1989) e Italia (Gramiccia *et al.*, 1992b). Nosotros hemos encontrado MAD-1 en dos casos de LV en inmunocompetentes, uno de Madrid y otro de Segovia y también en una enferma que había sufrido un trasplante renal. Dentro del grupo de sujetos coinfectados, MAD-1 estuvo representado en 19 aislados, 14 de Madrid y 5 de Mallorca, lo que representa sólo el 43% del total. Uno de los aislados se aisló de una LC en un homosexual de la provincia de Madrid.

Otro de los aislados caracterizados dentro del grupo de LV y VIH+, de un sujeto de Alicante resultó ser un zimodema MAD-28. Este zimodema se aisló por primera vez en España en un caso de LV en una niña de un año con residencia habitual en Barcelona (Portús *et al.*, 1986), pero se ha podido aislar también de sujetos VIH+ en esa ciudad (Portús *et al.*, 1989).

En la leishmaniosis visceral en el sujeto coinfectado es común no sólo encontrar aislados pertenecientes a zimodemas viscerales como el ZM-1, sino también zimodemas cutáneos debido a la anergia en la que se encuentran estos enfermos (Jiménez *et al.*, 1991, 1993). Así, el ZM-29 se había descrito en España como responsable de LC en un adulto con residencia en Barcelona (Portús *et al.*, 1986) y el ZM-33 se había aislado de lesiones cutáneas en un niño de 8 años y en un sujeto VIH+ (Portús *et al.*, 1989). Nosotros hemos encontrado ambos zimodemas en este tipo de asociación. Así MAD-33 fue aislado en 5 ocasiones de médula ósea y en una de LC, en uno de los casos mediante xenodiagnóstico (Molina *et al.*, 1992). Tres aislados de médula ósea de Madrid, Mallorca y Alicante resultaron ser MAD-29.

El ZM-24 ha sido aislado de lesiones cutáneas en el norte de Argelia (Belazzoug *et*

et al., 1985, 1986), norte de Túnez (Pratlong *et al.*, 1989; Ben Ismail *et al.*, 1986), e Italia (Gramiccia *et al.*, 1986, 1987, 1992b). Así mismo, se ha aislado en Argelia de *Phlebotomus perfiliewi* (Izri y Belazzoug, 1993) y en Portugal de *Phlebotomus ariasi* (Pires *et al.*, 1991; Abranches *et al.*, 1992). Este zimodema ha sido descrito en la asociación leishmaniosis y VIH+ en Italia (Gradoni *et al.*, 1990; Gramiccia *et al.*, 1992b), Francia (Marty *et al.*, 1991; Rosenthal *et al.*, 1993) y Portugal (Abranches *et al.*, 1993; Campino *et al.*, 1994) y recientemente en España (Riera *et al.*, 1994; Serra *et al.*, 1994). No sólo lo hemos encontrado en siete aislados de sujetos VIH+ todos ADVP de la provincia de Madrid si no que también ha sido aislado en sujetos inmunocompetentes tanto como agente productor de LV (1) como de LC (1) en adultos de Madrid, resultado que coincide con los obtenidos por Serra *et al.* (1994) quienes describen un caso de LC debida al zimodema MON-24 en Palma de Mallorca.

Sólo uno de los aislados dentro del grupo *Leishmania* y VIH+ resultó ser MAD-34, zimodema dermatropo, descrito hasta el momento en Francia en sujetos inmunocompetentes (Rioux *et al.*, 1986; Moreno *et al.*, 1986b) y en Argelia (Pratlong *et al.*, 1994), recientemente este zimodema ha sido descrito también en la asociación *Leishmania*-VIH (Riera *et al.*, 1994). Nosotros también hemos aislado este zimodema en inmunocompetentes, en un caso de LV de Menorca y en dos casos de LC, ambos de Madrid.

Los aislados Garrido, Cuadros, Lara (LV y VIH+) y Navarro (LC y VIH+) resultaron ser una nueva variante enzimática, MAD-183, aislada de tres sujetos ADVP de Madrid y Córdoba y un hemofílico de Jaén. Este mismo zimodema ha sido descrito en Francia en dos casos de LV y VIH+, los dos ADVP y originarios de Valencia lugar en el que contrajeron la infección de acuerdo a las historias clínicas (Pratlong *et al.*, 1993; Lamaury *et al.*, 1993) y en España (Riera *et al.*, 1994). Hasta el momento este zimodema sólo ha sido descrito en nuestro país en esta asociación y probablemente se trate de un nuevo zimodema con características dermatropas que visceraliza en sujetos VIH+, ya que nosotros lo hemos aislado también en un caso de LC y VIH+.

El zimodema denominado por nosotros MAD-501, sujeto a renominación con código internacional por el Laboratoire d'Ecologie Médicale, Montpellier, es una nueva variante enzimática que hemos encontrado en dos aislados de la provincia de Madrid. De uno de los sujetos de los que se aisló esta nueva variante no se consiguieron los datos clínico-

epidemiológicos, pero el otro sujeto era homosexual. Este nuevo zimodema comparte características enzimáticas con el ZM-29, dermatropo, y el ZM-183 (probablemente dermatropo), por lo que pensamos que se trate de otro zimodema que sufra visceralización en este tipo de sujetos, aunque todavía no se ha encontrado en LC (Jiménez *et al.*, en prensa).

Los zimodemas MAD-183 y MAD-501 no se han encontrado en leishmaniosis habituales hasta ahora, por lo que parecen ser variantes que sólo producen leishmaniosis en sujetos coinfectados. Una observación similar se ha realizado en Italia donde se ha descrito un caso de LV en VIH+ debida a una nueva variante, MON-136, zimodema probablemente dermatropo que comparte características enzimáticas con dos zimodemas dermatropos MON-78 y MON-111 agentes productores de LC en inmunocompetentes (Gramiccia *et al.*, 1992b).

En España más del 85% de los casos de VIH asociado a leishmaniosis tiene lugar en ADVP. En nuestro caso en concreto, de 44 aislados estudiados y teniendo en cuenta que se conocían los datos de 38 de ellos, el 84,2% procedían de sujetos ADVP (32), 10,5% de homosexuales (4), 2,6% de hemofílicos (1) y un 2,6% de heterosexuales (1). De 34 aislados, 26 de ellos (76,4%) fueron aislados de sujetos que presentaban infecciones oportunistas diagnósticas de SIDA (grupo IVC-1), 4 aislados (11,7%) de sujetos asintomáticos (grupo II), 3 aislados (8,8%) de sujetos que presentaban otras infecciones asociadas además de las diagnósticas de SIDA (grupo IVC-2) y 1 aislado (2,9%) de un sujeto que tenía neoplasias asociadas (grupo IVD). La variabilidad en el número de zimodemas encontrado dentro de este grupo y la presencia de alguno de ellos que no son comunes en sujetos inmunocompetentes, como es el caso de los zimodemas MAD-183 y MAD-501, hasta ahora sólo descritos en esta asociación, y su ausencia en aislados caninos, permite establecer la hipótesis de que estos sujetos coinfectados puedan actuar como reservorios potenciales de estos zimodemas dentro de la comunidad de ADVP. En este sentido, las jeringuillas podrían actuar como vehículos de los macrófagos circulantes infectados (Alvar y Jiménez, 1994). Hay que tener en cuenta que en estos sujetos se pueden observar con relativa facilidad amastigotes en macrófagos de sangre periférica (Martínez *et al.*, 1993) y que *Phlebotomus perniciosus*, alimentados experimentalmente con sangre de estos enfermos, reproducen sistemáticamente la infección (Molina *et al.*, 1994a). Por otro lado, la presencia de nuevos zimodemas que visceralizan en sujetos VIH+ que

no aparecen en inmunocompetentes sugeriría la avirulencia de los mismos, de manera que el tropismo de *L. (L.) infantum* y por tanto su virulencia estaría influenciada por el estado inmunológico del sujeto en cuestión (Gradoni y Gramiccia, 1994).

En cuanto a las relaciones filogenéticas, el dendograma construido a partir de los datos del polimorfismo enzimático (Material y Métodos 3.5.) nos ha permitido establecer que las distancias entre todos los zimodemas son bajas. La distancia media para el conjunto de aislados de sujetos inmunocompetentes e inmunosuprimidos ha sido de 0'2. A este grado tan bajo, la jerarquización no es significativa (ver Figura 14, página 103). La mayor proximidad fenética o mayor grado de similaridad (menor distancia) corresponde a aquellos zimodemas que difieren en la movilidad para un sólo sistema enzimático (0'11) como entre MAD-1 y MAD-34, MAD-34 y MAD-183, MAD-34 y MAD-24, MAD-501 y MAD-29, MAD-33 y MAD-29, MAD-80 y MAD-24, MAD-28 y MAD-24. Por el contrario, la distancia máxima se da entre aquellos zimodemas que presentan diferente movilidad para cuatro sistemas enzimáticos como MAD-1 y MAD-501 (0'40). MAD-501 se encuentra, sin embargo, más próximo a MAD-29 (0'11), zimodema dermatropo, y MAD-183 más relacionado con MAD-34 (0'11), también dermatropo, lo que apoyaría como dijimos anteriormente que ambas variantes, hasta el momento sólo encontradas en casos de coinfección, puedan ser zimodemas dermatropos que visceralizan en este tipo de sujetos como dijimos anteriormente.

El estudio de la variabilidad de *L. (L.) infantum* en términos de teoría clonal y genética de poblaciones se realizó sobre el grupo de aislados de sujetos VIH+, por estar representado por un mayor número de aislados que reunía similares características epidemiológicas. Todas las pruebas de recombinación se explicaron en el apartado correspondiente de Material y Métodos y aunque no son indicativas directamente de que el modo de propagación sea clonal, sí nos dan una aproximación de desviación a la panmixia. Hay que tener en cuenta que entre ambos tipos de población, es decir, población clonal y población panmíctica pueden existir un sinnúmero de situaciones intermedias, al igual que se ha podido demostrar también en las poblaciones bacterianas (Smith *et al.*, 1993). Esta misma situación se da en poblaciones de protozoos parásitos y así, por ejemplo, se habla de "clonalidad epidémica" en *Plasmodium falciparum*, especie considerada panmíctica en la que se han observado, sin embargo, episodios de propagación clonal en algunas poblaciones (Read *et al.*, 1992; Ben Abderrazak, 1993); y en algunas poblaciones

de *Trypanosoma cruzi* se han observado episodios de "evolución clonal" debido a la gran variabilidad genética encontrada en algunos clones (Barnabé y Tibayrenc, 1994; Bastrenta *et al.*, 1994) a pesar de considerarse una especie básicamente clonal (Tibayrenc *et al.*, 1986; Tibayrenc y Ayala, 1987). El "modelo clonal" es perfectamente compatible con algunos fenómenos de sexualidad que se han observado en *Leishmania* (Pagès *et al.*, 1989; Lanotte y Rioux, 1990; Bañuls, 1993) y *T. brucei* (Tait y Turner, 1990; Jenni, 1990) ya que no implica que estos fenómenos no se puedan dar o estén ausentes, si no que no son lo suficientemente frecuentes para romper la estructura de la población clonal (Tibayrenc, 1994).

En nuestro caso, todas las pruebas de recombinación fueron significativas, lo que implicaría que en el conjunto de la población estudiada, aislados de sujetos VIH+, hay una desviación a la panmixia o libre recombinación lo que constituye la base del "modelo clonal" de reproducción propuesto para algunos protozoos parásitos (Tibayrenc *et al.*, 1990; Tibayrenc y Ayala, 1991). De esta forma los genotipos aislados de sujetos VIH+ podrían ser equiparados a clones naturales o clones estrechamente relacionados, estables en el tiempo y en el espacio y por lo tanto podrían ser utilizados como marcadores genéticos en estudios epidemiológicos (Tibayrenc y Ben Abderrazak, 1993). Sin embargo, es necesario llevar a cabo más estudios en los que se utilice un mayor número de aislados que reúnan condiciones estrictas de simpatría, y quizá un mayor número de sistemas enzimáticos que nos permita establecer aún mayor variabilidad y confirmar así la estructura inicialmente clonal de la población de *L. (L.) infantum* en sujetos VIH+. Estos estudios adicionales nos permitirían estimar la estabilidad de estos clones a lo largo del tiempo que, por otro lado, podría perderse si se dieran algunos fenómenos aislados de recombinación o intercambio genético. También sería necesario estudiar un número elevado de aislados de sujetos inmunocompetentes y comparar la estructura de ambas poblaciones de parásitos.

5.2. - Caracterización por amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD).

La aplicación de la técnica de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios (RAPD) ha permitido la obtención de marcadores genéticos en un amplio abanico de organismos (ver Tabla 3). Estudios previos llevados a cabo en *Leishmania* han demostrado el valor de esta técnica en el análisis de genética de poblaciones (Tibayrenc *et al.*, 1993; Bañuls, 1993; Baixench, 1994).

La aplicación del RAPD al total de 50 aislados de *L. (L.) infantum* (43 VIH+ y 7 inmunocompetentes) previamente caracterizados, 5 cepas de referencia de *L. (L.) infantum*, 5 cepas de referencia del Viejo Mundo y 5 cepas de referencia del Nuevo Mundo nos confirma su valor con fines taxonómicos. Los siete iniciadores utilizados A1, A2, A5, A7, A10, A12 y A15 han permitido diferenciar *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* y *L. (L.) donovani* del resto de las especies para las que se obtienen patrones muy diferentes. El iniciador A15 ha discriminado *L. (L.) infantum* de *L. (L.) donovani* (ver Figura 19, página 109). Esta técnica pone en evidencia bandas mayoritarias específicas para los complejos de *L. infantum* y *L. donovani* (iniciador A1 y A7) o sólo para el complejo al que pertenece *L. (L.) infantum* (iniciador A15) (caracteres sinapomórficos) (Figura 15, página 105; Figura 17, página 107 y Figura 19, página 109). Estos caracteres sinapomórficos ya habían sido observados previamente en *Trypanosoma cruzi* (Tibayrenc *et al.*, 1993). Los fragmentos sinapomórficos podrían ser utilizados para desarrollar sondas específicas, si bien algunos autores opinan que es improbable que estas sondas sean muy sensibles (Wilson, 1992). En este sentido, los fragmentos que parecen únicos en geles de agarosa, podrían estar constituidos por dos o más bandas cuando se utilizan geles de poliacrilamida que permiten una mayor resolución (Bianciotto, comunicación personal). Esta misma observación ha sido recientemente publicada en relación a la caracterización enzimática (Piarroux *et al.*, 1994). La técnica de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios ha puesto de manifiesto una mayor variabilidad intraespecífica en *L. (L.) infantum* con los siete iniciadores utilizados, en relación a la variabilidad encontrada mediante caracterización enzimática para el mismo conjunto de aislados. En el total de 50 aislados estudiados, 43 de sujetos VIH+ y 7 inmunocompetentes, el número de genotipos multilocus o "rapdemas" ha sido muy elevado situándose en 41. La variabilidad genotípica (n° de zimodemas o rapdemas/ n° de aislados) ha sido de 0,8 mientras que con el análisis enzimático ha sido de 0,19.

En cuanto a las relaciones filogenéticas, la distancia genética media para el conjunto de aislados de sujetos inmunocompetentes e inmunosuprimidos ha sido de 0'31, un poco más alta, como resultado de la mayor variabilidad, en relación a los isoenzimas (0'2). Como se puede observar en el dendograma, las cepas de referencia correspondientes a las diferentes especies de *Leishmania* quedan separadas de los complejos de *L. infantum* y *L. donovani* (ver Figura 20, página 112). No hemos podido establecer ninguna correlación entre los aislados agrupados dentro del mismo genotipo en cuanto a origen geográfico y zimodema al que pertenecían. Así, los aislados Tejúcar, Carrasco y Armenteros quedaron agrupados en el mismo genotipo, pero ni pertenecían al mismo zimodema ni tenían el mismo origen geográfico. Quedaron agrupados dentro del mismo genotipo dos aislados pertenecientes al mismo zimodema, Justo y Clemente (MAD-24), que tenían el mismo origen geográfico, pero, por el contrario, dentro de este genotipo quedó incluido también el aislado Massa (MAD-34), aislado en Mallorca. Los aislados Anastasio (MAD-33) y Natalio (MAD-29), ambos de Madrid, quedaron agrupados en el mismo genotipo junto con dos cepas de referencia LEM-307 (MON-29) e IPT-1 (MON-1), de origen español y tunecino respectivamente. Lo mismo ocurrió con los aislados 59933, 5825, Milagros y Seguí (inmunocompetente) agrupados en el mismo genotipo, si bien los dos primeros pertenecían al mismo zimodema (MAD-33), y los otros dos a los zimodemas MAD-1 y MAD-34 respectivamente. En el caso de los aislados Arce (MAD-28) y Puma (MAD-1) nos encontramos con la misma situación. Por lo tanto, los aislados que pertenecen a un mismo zimodema pueden corresponder a genotipos y procedencias muy diversos.

La aplicación del análisis de genética de poblaciones sobre el conjunto de aislados de sujetos VIH+, por reunir similares características epidemiológicas, no nos ha permitido determinar la estructura de la población de *L. (L.) infantum* (ver Material y Métodos 3.5.2.). Si bien dos pruebas (d1 y e) fueron significativas, lo que indicaría una desviación de la panmixia, la probabilidad de observar un desequilibrio de ligazón (prueba f) tan alto como el que es realmente observado en la muestra, no fué significativa, prueba más concluyente que d1, d2 y e. En este caso, por tanto, la población no es básicamente clonal pero tampoco se puede decir que sea panmíctica.

Cuando se realizó la correlación entre las distancias genéticas obtenidas en el análisis enzimático y las observadas mediante la técnica de amplificación de ADN con iniciadores arbitrarios para el conjunto de aislados de sujetos VIH+ y cepas de referencia, se obtuvo

un índice de correlación ($r=0.5$). Sin embargo, el coeficiente de correlación fue negativo cuando la correlación se realizó entre las distancias genéticas sin tener en cuenta las cepas de referencia, quizá debido a que las distancias comparadas en este caso eran más bajas. Baixench (1994) obtiene una excelente correlación entre ambas técnicas ($r=0.9$) cuando estudia 22 aislados de *L. (L.) infantum* de sujetos VIH+ del sureste francés, cepas de referencia de *L. (L.) infantum* y diferentes especies de *Leishmania*. El coeficiente de correlación sin embargo fue de 0.1 para el conjunto de 17 aislados de sujetos VIH+ que reunía mayores condiciones de simpatria (aislados de la región de Provence-Côte d'Azur). En ningún caso estos resultados deberían ser comparados a los obtenidos por nosotros ya que el conjunto de iniciadores no fue el mismo, ni se siguió el mismo método de extracción de ADN y la caracterización enzimática se realizó en acetato de celulosa utilizando otros sistemas enzimáticos, por lo en ningún momento las condiciones de trabajo fueron las mismas.

La técnica de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios promete ser una herramienta potente para estudios taxonómicos así como en el estudio de la variabilidad de *L. (L.) infantum*. Sin embargo, es necesario llevar a cabo estudios adicionales más amplios, utilizando un mayor número de aislados que además reúnan estrictas condiciones de simpatria. En este sentido hay que tener en cuenta que el total de aislados caracterizados se obtuvieron en un periodo de varios años (1988 a 1993) y procedían de diferentes áreas geográficas lo que podría haber influido en el modo de propagación de algunos genotipos.

5.3.- Caracterización mediante sondas de ADN

El ADNg de *Leishmania* contiene secuencias con varios grados de conservación que pueden ser utilizadas para la caracterización de aislados mediante polimorfismo en el tamaño de fragmentos de restricción (RFLP). Las dos sondas utilizadas en este trabajo 7-059 y pDK20 cuyas características se especificaron en el apartado 3.3.7. de Material y Métodos, ya habían demostrado su valor en la caracterización de diferentes especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo (Van Eys *et al.*, 1989; Van Eys *et al.*, 1991). Sin embargo, no habían sido utilizadas en estudios de variabilidad dentro de una misma especie.

La caracterización de algunos aislados humanos con la sonda de ADNg 7-059 , específica para el complejo de *Leishmania donovani* s.l. (Van Eys *et al.*, 1989) nos ha permitido observar cierta heterogenicidad entre los mismos como se puede observar en la Figura 21, página 114 y Figura 22, página 115. Los 17 aislados estudiados fueron agrupados en relación al diferente patrón de hibridación (presencia o ausencia de bandas) en 5 genotipos diferentes. El análisis de agrupamiento y dendograma resultante aplicando el índice de similaridad de Jaccard mediante el programa de taxonomía TAXAN se muestra en la Figura 23, página 116. En el genotipo A quedaron agrupados los aislados Espin (MAD-1), Anastasio (MAD-33), Palma y Natalio (MAD-29) y BCN-65 (MON-28) de diferente origen geográfico. El genotipo B reunió a los aislados Armenteros, Clemente y Antúnez, los tres zimodemas 24 de Madrid, y a la cepa de referencia LEM-307 (MON-29). Tres aislados quedaron incluidos en el genotipo C Tejúcar (MAD-33), Garrido (MAD-183) y la cepa de referencia LEM-356 (MON-33). La cepa de referencia del zimodema 80, LEM-425 quedó individualizada en el genotipo D. Por último, el genotipo E reunió a los aislados Estesó (MAD-1), Angel (MAD-33), Massa (MAD-34) y Cuadros (MAD-183). Estos resultados no nos han permitido encontrar ninguna correlación entre zimodemas y genotipos establecidos.

La sonda pDK20, con la que se obtienen patrones característicos para diferentes especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo y que además diferencia *L. (L.) infantum* de *L. (L.) donovani* para las que da un patrón característico (Van Eys *et al.*, 1991), nos ha permitido establecer cierto grado de variabilidad entre los aislados estudiados (ver Figuras 24 y 25, páginas 118 y 119). Todos ellos presentaron la banda de 18 Kb característica para *L. (L.) infantum* y *L. (L.) chagasi*. Algunos de los aislados presentaron

además de la banda de 18 Kb una banda de 4 Kb característica junto con la de 14 Kb para *L. (L.) donovani*. La cepa de referencia LEM-425 (MON-80), presentó dos bandas adicionales de aproximadamente 17 y 16 Kb (Figura 26, página 120). El dendograma resultante del análisis de agrupamiento se muestra en la Figura 27, página 121. Dentro de los aislados estudiados pudimos establecer 3 genotipos diferentes, el genotipo A agrupó a aquellos aislados que no presentaron la banda de 4 Kb, en el genotipo B quedaron incluidos aquellos que la presentaban y por último la cepa de referencia LEM-425 quedó individualizada en el genotipo C debido a la presencia de las dos bandas de aproximadamente 17 y 16 Kb. La similaridad entre los genotipos A y B fue 0'750, la de A y B con C fue 0'500 y 0'600 respectivamente. La similaridad de *L. (L.) donovani* con los aislados incluidos en el genotipo A que presentaban la banda de 4 Kb fue más elevada (0'750) que con los incluidos en el genotipo que no la tenían (0'500) (datos que no aparecen en el dendograma). Estos datos sugieren que, siendo todos los aislados *L. (L.) infantum* existe una mayor proximidad filogenética de *L. (L.) donovani* con los aislados incluidos en el genotipo A que con los incluidos en el B.

5.4.- Caracterización del aislado ANA

El aislado denominado ANA, MHOM/ES/91/LLM-325, se obtuvo a partir del aspirado de médula practicado a una enferma ADVP y VIH+ (grupo IVC-1) de la provincia de Madrid. Hacía un año que había visitado Marruecos, Nueva York y Miami. En 1986 se le había diagnosticado infección por VIH y tenía antecedentes de dos episodios de infección por Herpes zoster, uno en 1985 y otro en 1987. Dos meses antes de su ingreso en el hospital había comenzado a tener episodios de febrícula vespertina. La exploración clínica reveló microadenopatías, hepato y esplenomegalia (radiológica), presentaba hemorragias retinianas, probable neumonía por *Pneumocystis carinii*, viremia por citomegalovirus, candidosis oral y herpes labial. La serología positiva a *Leishmania* (título IFI:1/512) y el resultado positivo del cultivo del aspirado de médula ósea confirmó el diagnóstico de leishmaniosis visceral que fué tratada con antimoniales. La sintomatología que presentaba esta enferma y la observación en el cultivo de promastigotes, y no epimastigotes, descartó la posibilidad de que nos encontráramos ante un remoto caso de *Trypanosoma cruzi* (ver Figura 51, página 173).

Este parásito se creció en masa en medio RPMI, observándose una multiplicación extraordinariamente rápida de los promastigotes y un movimiento característico de los mismos. Cuando se inició su caracterización enzimática junto con los otros aislados de sujetos VIH+, nos sorprendió la aberrante movilidad electroforética que presentaba para los diferentes sistemas enzimáticos (Figura 28, página 125). Los valores de cada uno de los electromorfos obtenidos con este aislado no se correspondían a los valores presentados por los diferentes zimodemas de *L. (L.) infantum* (ver Tabla 19, página 86). Además, estos valores tampoco coincidían con los obtenidos por nosotros con otras especies de *Leishmania* utilizadas en este trabajo, ni tampoco con los descritos en la literatura para otros zimodemas de diferentes especies de *Leishmania* (Rioux *et al.*, 1990).

Ante estas observaciones iniciales, nos preguntamos si estaríamos ante un nuevo zimodema de *L. (L.) infantum*, otra especie de *Leishmania*, o bien ante otro tripanosomátido.

La caracterización inicial del aislado ANA con la sonda de ADN_g, 7-059, fue sorprendente ya que no hubo hibridación cruzada con el ADN_g del mismo con esta sonda (Figura 29, página 126). Esta sonda, permite diferenciar todas las especies patógenas de *Leishmania* del Viejo Mundo, para las que da un patrón característico (Van Eys *et al.*,

1989). Así mismo, tampoco se obtuvo hibridación cruzada cuando se utilizó la sonda de ADN_g pDK20 (Figura 30, página 127), para la que también se obtienen patrones de hibridación característicos según las diferentes especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo. Esta sonda permite además diferenciar *L. (L.) infantum* de *L. (L.) donovani* (Van Eys *et al.*, 1991). Cuando utilizamos la sonda pDK10, que también ha demostrado su eficacia en la caracterización de especies de *Leishmania* del Viejo Mundo, y con la que no se obtiene hibridación cruzada con *S. tarentolae* (Guizani *et al.*, 1994), tampoco el aislado ANA presentó hibridación cruzada (Figura 31, página 128).

Dentro de la familia Trypanosomatidae, subreino Protozoa (ver Figura 1, página 2), los géneros *Leishmania* y *Trypanosoma* son digenéticos y, como patógenos del hombre y animales de producción o compañía son los más estudiados. El resto de los géneros, *Endotrypanum*, *Sauroleishmania*, *Blastocrithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia* todos monogenéticos, a excepción de *Endotrypanum* y *Phytomonas*, que también son digenéticos, están menos estudiados. Todos menos *Phytomonas* son patógenos de mamíferos (exceptuando el humano), reptiles, insectos, y otros invertebrados. *Phytomonas* es parásito de plantas e insectos. Algunos aspectos de la biología y fisiología de estos tripanosomátidos han sido revisados por McGhee y Cosgrove (1980). Estos géneros incluidos en los denominados pequeños tripanosomátidos, han sido definidos basándose fundamentalmente en criterios morfológicos, sin embargo, estos criterios son insuficientes con fines taxonómicos (Wallace *et al.*, 1983). La distinción entre diferentes especies o aislados de tripanosomátidos de insectos se ha realizado a partir de una variedad de métodos tales como el análisis de los patrones de ADN_k obtenidos con enzimas de restricción (Camargo *et al.*, 1982), caracterización enzimática (Goncalves de Lima *et al.*, 1979; Mebrahtu *et al.*, 1992), serotipia (Dooris y McGhee, 1976) y comparación de características biológicas (Roitman *et al.*, 1977). La presencia de un sitio de restricción específico para el enzima PvuII en la secuencia de la subunidad ribosomal SSU ARNr de *Leishmania* spp. ha sido utilizada para diferenciar estos flagelados de *Trypanosoma* spp. (Uliana *et al.*, 1991). La presencia o ausencia de los sitios de restricción para los enzimas PvuII y HindIII en las subunidades SSU y LSU en la secuencia del ARNr se ha utilizado para la identificación de estos tripanosomátidos (Camargo *et al.*, 1992).

Estos protozoos, especialmente *Crithidia*, han sido utilizados como modelos experimentales para estudiar aspectos bioquímicos de los miembros de la familia

Trypanosomatidae como el fenómeno de ligación post-transcripcional ("trans-splicing") de los pre-mRNAs (Campbell *et al.*, 1984) así como para estudiar los mecanismos básicos de su evolución. Recientemente se ha podido establecer la posición filogenética de estos tripanosomátidos dentro de la familia Trypanosomatidae basándose en el estudio de la secuencia de SSU rRNA (subunidad pequeña de los ribosomas) (Fernandes *et al.*, 1993). Así mismo, se ha podido probar la heterogeneidad filogenética de tres especies de *Crithidia* en relación a *C. fasciculata* (Du y Chang, 1994).

La finalidad perseguida en los siguientes experimentos era confirmar que el aislado ANA no pertenecía al género *Leishmania* y establecer además su relación con otros tripanosomátidos. Para ello se realizaron hibridaciones del ADNk y ADNg del aislado ANA, otros tripanosomátidos y los controles correspondientes de *Leishmania* con las sondas de ADNk (k-1/307) y ADNg (7-059, pDK20 y pDK10).

Las hibridaciones del ADNg del aislado ANA, *L. (L.) infantum* y otros tripanosomátidos con las sondas de ADNg 7-059, pDK20 y pDK10, confirmaron que este aislado no pertenecía al género *Leishmania* (Figuras 32 a 34, páginas 129 a 131). El patrón de restricción del ADNk digerido con HaeIII (esquizodemas) del aislado ANA y los otros tripanosomátidos, no permitió establecer ninguna similaridad entre este aislado y los otros flagelados. Cuando se realizó la hibridación posterior con la sonda k-1/307 de ADNk, sólo hubo hibridación con *L. (L.) infantum* (Figura 35, página 132). Trabajos previos con esta sonda habían demostrado su especificidad para el complejo de *L. (L.) donovani* y la ausencia de hibridación cruzada con el ADNk de especies de *Leishmania* del Nuevo Mundo y *C. fasciculata* (Alvar *et al.*, 1989b).

En otro estudio posterior intentamos establecer el grado de homología del ADNk y ADNg del aislado ANA con otras especies de *Leishmania* y otros tripanosomátidos por transferencia del ADN mediante vacío y posterior hibridación en forma de mancha ("slot-blot"). No encontramos ningún grado de homología entre el ADNk del aislado ANA y todas las demás especies de *Leishmania* como era de esperar, pero tampoco se obtuvo con otros tripanosomátidos. Sólo hubo una ligerísima señal de hibridación en el caso de *E. schaudinni* y *C. fasciculata*, no significativa debido a la baja similaridad de las secuencias conservadas dentro de los minicrulos entre las diferentes especies de tripanosomátidos (ver Figura 36, página 133).

Cuando se repitió el mismo experimento, pero con ADNg, se obtuvo una discreta

hibridación con el mismo grado de homología del ADNg con todas las especies de *Leishmania* y tripanosomátidos debido al mayor número de secuencias conservadas en el ADNg entre los diferentes tripanosomátidos. La diferencia de hibridación entre el ADNg de ANA y los otros tripanosomátidos fué sin embargo, de varios órdenes (Figura 37, página 134).

Para poder establecer de manera más precisa la identidad del aislado ANA realizamos la comparación del aislado ANA con otros tripanosomátidos mediante análisis enzimático (15 sistemas). Los valores de los electromorfos obtenidos con cada sistema enzimático para el aislado ANA fueron muy diferentes a los obtenidos para el resto de los tripanosomátidos lo que no nos permitió incluirlo en ninguno de estos géneros (Figuras 38 a 42 y Tabla 25, páginas 136 a 141). Lamentablemente no conseguimos representantes ni de otras especies ni de otros géneros.

El dendrograma resultante del estudio del polimorfismo enzimático llevado a cabo con el programa de taxonomía TAXAN (Figura 43, página 142), no nos permitió establecer ningún grado de proximidad filogenética entre esta aislado y *Leishmania*, ni tampoco con los otros tripanosomátidos estudiados.

Existe sólo un antecedente en la literatura sobre una posible infección por *Herpetomonas* de una mujer en Texas (McGhee y Reason, datos no publicados) y algunas observaciones en Kenya de flagelados aislados de sujetos que, mediante análisis enzimático o densidad de flotación del ADNk, mostraron mayor similitud con *Herpetomonas* y con *Crithidia* que con *Leishmania* (Githure *et al.*, 1986; Mebrahtu *et al.*, 1992; Barker, comunicación personal). Así mismo, se ha aislado un flagelado no perteneciente al género *Leishmania* en un enfermo coinfectado (Dedet, comunicación personal)

Nuestros resultados no son concluyentes desde el punto de vista taxonómico, pero ofrecen una información importante sobre la vulnerabilidad de los sujetos inmunodeprimidos a cualquier microorganismo. En sujetos coinfectados la leishmaniosis comparte sintomatología de las leishmaniosis habituales es decir, presencia de fiebre, esplenomegalia y leucopenia entre otros síntomas (Fernández-Guerrero *et al.*, 1987; Altés *et al.*, 1990; Montalbán *et al.*, 1990; Medrano *et al.*, 1992). Esta enferma presentaba una sintomatología típica de LV/VIH como fiebre, hepatoesplenomegalia, leucopenia, linfadenopatías, síntomas poco específicos que aparecen también en otros cuadros como tuberculosis miliar en el enfermo de SIDA.

Es difícil especular sobre el posible mecanismo de transmisión de este flagelado. La hipótesis más pausable podría ser la de la transmisión fecal como sucede en los tripanosomátidos de estación posterior como son la mayoría de los estudiados por nosotros aquí. Se desconoce la magnitud que en la naturaleza tienen las infecciones por estos flagelados y, por consiguiente, la facilidad por la que pueden acceder al humano. En España se han aislado en algunas ocasiones tripanosomátidos de *Sergentomyia minuta* (Gállego *et al.*, 1993b).

El estudio de microscopía electrónica tanto de barrido como de transmisión, no nos aportó información adicional sobre este tripanosomátido. En la de barrido se observaron promastigotes indistinguibles de la cepa de referencia LEM-75 (Figura 52, página 174). La observación de diferentes secciones al microscopio de transmisión no nos permitió distinguir ninguna estructura que nos ayudara en la clasificación de este flagelado (ver Figura 53, página 175). En los flagelados aislados por Barker en un enfermo con una supuesta leishmaniosis visceral en Kenya, y por Dedet en un coinfectado, la característica más importante era una bolsa flagelar que ocupaba un tercio de la superficie del parásito. No fue nuestro caso (Figura 54, página 176)

Continúa el estudio del aislado ANA con los tripanosomátidos *Phytomonas*, *Blastocrithidia* y *Trypanosoma*, así como con infecciones experimentales en *Phlebotomus perniciosus*.

5.3.- Caracterización del aislado humano de Angola

Según el historial clínico este sujeto, llamado Paulo, de 26 años, inmunocompetente y originario de Angola sólo llevaba tres semanas en España cuando acudió a la consulta médica. Tenía fiebre (40°C), sufría pérdida de peso y presentaba una esplenomegalia que alcanzaba la fosa ilíaca derecha. El cultivo del aspirado de médula ósea puso en evidencia la presencia de promastigotes. Este sujeto no tenía antecedentes de haber trabajado en otros países, lo que descartaba la posibilidad de que la leishmaniosis hubiera sido contraída fuera de Angola.

Las dos especies responsables de LV incluidas en el grupo de *L. (L.) donovani sensu lato* s.l son *L. (L.) donovani* s.s distribuida principalmente en la India y en el este de África, y *L. (L.) infantum* en los países de la Cuenca Mediterránea (WHO, 1990). Son muy pocos los datos disponibles acerca de casos de LV en los países africanos al sur del ecuador. Hasta este momento sólo había antecedentes de un caso de leishmaniosis visceral en Angola pero sin información acerca del mismo (datos no publicados) y muy pocos los casos descritos de LV en los países limítrofes con Angola. Así, en Zaire se describió un caso de LV en 1978 y seis casos de LC entre 1983 y 1988 y en los años setenta se denunciaron dos casos de LV en Zambia. En ninguna ocasión los parásitos fueron caracterizados. En el Congo no hay ningún caso conocido de leishmaniosis y en Namibia hay 24 casos de LC causada por *L. (L.) tropica* (Desjeux, 1991).

En el Viejo Mundo, otras especies además de *L. (L.) donovani* s.l. pueden producir LV en situaciones especiales, principalmente en casos de inmunosupresión. Así por ejemplo, hay datos de LV producida por *L. (L.) tropica* en Sudán (Schnur *et al.*, 1981) y casos de LV producida también por *L. (L.) tropica* en personal militar americano que intervino en la operación "Tormenta del desierto" en la Guerra del Golfo (Killick-Kendrick, 1992; Magill *et al.*, 1993). Por otro lado, existen casos de leishmaniosis mucocutánea debida a *L. (L.) infantum* (Alvar *et al.*, 1990) y leishmaniosis cutánea difusa por *L. (L.) major* (Ghalib *et al.*, 1992).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y el origen de este aislado de *Leishmania* realizamos su caracterización mediante sondas de ADN y análisis enzimático, tratándolo en un capítulo específico.

La caracterización de este aislado con la sonda ADNk 307/k-1 (Alvar *et al.*, 1989b)

nos permitió diferenciarlo de *L. (L.) tropica* e incluirla dentro del grupo de *L. (L.) donovani* s.l.. El fragmento utilizado como sonda está presente en diferentes familias de minicírculos y reconoce un elevado número de copias en la cepa homóloga LEM-307 (Figura 44, página 145).

La sonda de ADNg, 7-059, obtenida a partir de una librería de *L. (L.) infantum* ha demostrado su utilidad en la diferenciación de especies de *Leishmania* del Viejo Mundo incluyendo *L. (L.) donovani* s.l. pero no entre *L. (L.) donovani* s.s. y *L. (L.) infantum*. Las bandas de 6.3, 3.0, 1.6, 1.4 y 0.8 Kb son específicas para las especies de *Leishmania* que producen LV (Van Eys *et al.*, 1989). La presencia de estas bandas características en el patrón de hibridación del aislado Paulo nos permitió confirmarlo dentro del grupo *L. (L.) donovani* s.l. (Figura 45, página 146).

La sonda pDK20 ha demostrado su eficacia en la separación de *L. (L.) donovani* s.s. y *L. (L.) infantum* además de otras especies de *Leishmania*, para todas ellas se obtiene un patrón característico (Van Eys *et al.*, 1991). Así, esta sonda ha permitido identificar *L. (L.) donovani* s.l. y *L. (L.) major* como responsables de leishmaniosis en Sudán (Ghalib *et al.*, 1992). Esta sonda nos permitió caracterizar el aislado Paulo como *L. (L.) infantum* en función del fragmento de 18 Kb característico para esta especie que permite diferenciarla de *L. (L.) donovani* (Figura 46, página 147).

El patrón de hibridación obtenido con la sonda pDK10, cuya utilidad en la caracterización de diferentes especies de *Leishmania* del Viejo Mundo ha sido estudiada recientemente (Guizani *et al.*, 1994), nos permitió confirmar una vez más la identidad del aislado Paulo como *L. (L.) infantum* (Figura 47, página 148).

La caracterización mediante análisis enzimático de este aislado fue concluyente y demostró que se trataba de *L. (L.) infantum* MAD-1 (Tabla 26; Figuras 48 y 49). El zimodema 1 está ampliamente distribuido en países de la Cuenca Mediterránea, así como en Portugal. Es posible que este caso de LV debido a *L. (L.) infantum* en Angola pudiera ser una consecuencia de la introducción de un foco de leishmaniosis producido por la migración de población desde Portugal durante el periodo colonial, igual que se piensa que es probable que *L. (L.) chagasi* fuera introducida en América por los perros de los Conquistadores (Killick-Kendrick *et al.*, 1980). Por otro lado, nosotros pensamos que *L. (L.) infantum* podría haberse extendido por África y haberse establecido no sólo en el este, donde es bien conocida, si no también fuera de este área, en países como Senegal (Desjeux

et al., 1981), República Central Africana y hacia el sur en Angola. Este caso de LV en Angola es el primer caso tipificado de leishmaniosis de este país (Jiménez *et al.*, 1994). Sería necesario, por tanto llevar a cabo estudios epidemiológicos más profundos de la leishmaniasis visceral en África entre enfermos con esplenomegalia (Consultative meeting on HIV/*Leishmania* coinfections, Roma, 1994).

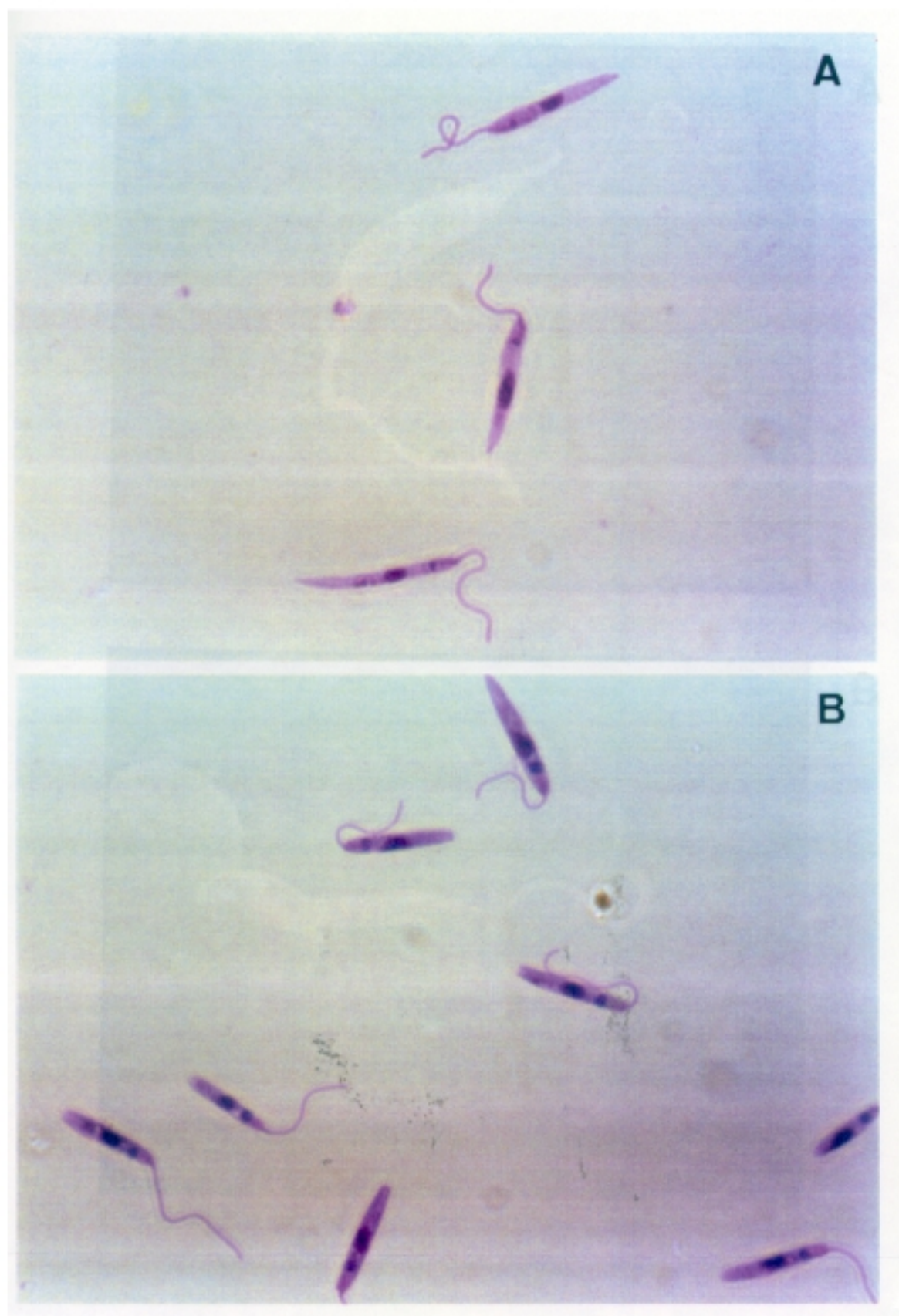
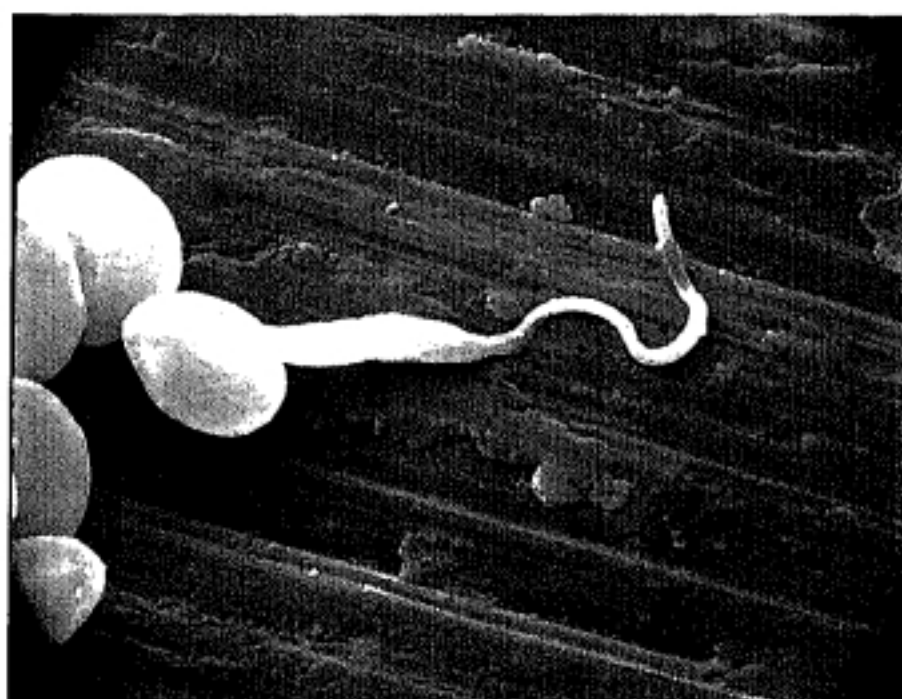


Figura 51.- Cultivo de promastigotes en medio RPMI. Giemsa (x 1250). Amplificado por 17. A.- Cepa de referencia LEM-75. B.- Aislado ANA.



A



B

Figura 52.- Microscopía electrónica de barrido (x 6000). A.- Promastigotes cepa de referencia LEM-75. B.- Aislado ANA



Figura 53.- Microscopía electrónica de transmisión del aislado ANA. Sección longitudinal de un promastigote en el que se observa su organización celular (x 24.000). F= Flagelo; K= kinetoplasto; V= vacuola; N= nucleo; CN= cuerpos negros.



Figura 54.- Microscopía electrónica de transmisión del aislado ANA. El flagelo se origina en el cuerpo basal por delante del kinetoplasto ($\times 56.000$). F= flagelo; K= kinetoplasto; CB= cuerpo basal; BF= bolsa flagelar; MT= microtúbulos; D= desmosomas.

CONCLUSIONES

6.- CONCLUSIONES

- 1.- En la coinfección *Leishmania*/VIH+, además de los zimodemas viscerales es común encontrar aislados pertenecientes a zimodemas cutáneos que sufren visceralización debido a la anergia en la que se encuentran estos enfermos. Así los zimodemas cutáneos 24, 29 y 33 se aislaron de médula ósea.
- 2.- En el grupo VIH+ se aíslan zimodemas nuevos para la literatura o desconocidos en los enfermos inmunocompetentes con LV, lo que permite establecer la hipótesis de que estos sujetos coinfectados pueden actuar como reservorios potenciales de estos zimodemas en la comunidad de ADVP, pudiendo en este sentido actuar las jeringuillas como vehículos de monocitos infectados. El sistema inmune puede ser un mecanismo de selección de zimodemas no virulentos en el sujeto inmunocompetente.
- 3.- El estudio de la variabilidad enzimática en términos de teoría clonal y genética de poblaciones nos ha permitido establecer que el modo de propagación de la población de aislados de *Leishmania* de sujetos VIH+ es clonal aunque esto no excluye la existencia de procesos de recombinación esporádicos. Los genotipos podrían ser equiparados a clones naturales estables en el espacio y en el tiempo pudiendo ser utilizados como marcadores genéticos para estudios epidemiológicos, sin embargo sería necesario llevar a cabo estudios adicionales para definir mejor la estabilidad de estos clones.
- 4.- La técnica de amplificación de ADN mediante iniciadores arbitrarios o RAPD promete ser una herramienta útil en estudios taxonómicos y de variabilidad de *L. (L.) infantum*, pero necesita ser perfeccionada para poder ser utilizada como marcador genético en estudios epidemiológicos.
- 5.- Las sondas de ADN_g, 7-059 y pDK20 que ya habían demostrado su valor taxonómico discriminando entre diferentes especies de *Leishmania* del Viejo y Nuevo Mundo han permitido establecer cierto grado de variabilidad entre diferentes aislados de *L. (L.) infantum* pudiendo ser utilizadas por tanto en estudios de variabilidad.

6.- La presencia en sujetos coinfectados de otros flagelados no pertenecientes al género *Leishmania*, como se desprende del estudio de caracterización del aislado ANA mediante sondas de ADN y análisis enzimático, aporta un dato importante sobre la vulnerabilidad de este tipo de sujetos a cualquier microorganismo.

7.- En este trabajo se ha caracterizado por primera vez un aislado de LV de Angola. La caracterización mediante sondas de ADN y el análisis enzimático nos ha permitido establecer que *L. (L.) infantum*, MAD-1, es responsable de LV en este país. Es necesario por tanto llevar a cabo estudios más profundos de LV en África entre enfermos que presenten esplenomegalia.

BIBLIOGRAFÍA

- Abaza, S.M., Sullivan, J.J., Visvesvara, G.S. (1991). Isoenzyme profiles of four strains of *Giardia lamblia* and their infectivity to jirds. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 63-68.
- Abdel-Hameed, A.A., Ahmed, B.O., Mohamedani, A.A., El-Harith, A., Van Eys, G. (1990). A case of diffuse cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 535-536.
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Pereira-Silva, M.C.D. (1984). Kala-azar in Portugal V. The sylvatic cycle in the enzootic endemic focus of Arrábida. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 197-200.
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Pereira-Silva, M.C.D. (1986). La leishmaniose viscérale dans la région de Lisbonne. Identification enzymatique. Interprétation structurales du foyer. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS INSERM, 1984)* (Rioux J.A., ed.), pp. 427-432. IMEEE, Montpellier.
- Abranches, P., Conceição-Silva, F.M., Ribeiro, M.M.S., Lopes, F.J., Teixeira-Gomes, L. (1983). Kala-azar in Portugal IV. The wild reservoir: the isolation of *Leishmania* from a fox. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 420-421.
- Abranches, P., Sampaio-Silva, M.I., Santos-Gomes, G.M., Avelino, L.C., Pires, C.A., Conceição-Silva, E.M., Seixas-Lopes, A., Silva-Pereira, M.C.D., Janz, J.G. (1992). Kala-azar in Portugal. VII. Epidemiological survey in Alijo (endemic region of Alto-Douro). *Research and Reviews in Parasitology*, 52: 121-124.
- Abranches, P., Santos-Gomes, G.M., Campino, L. (1993). Epidemiology of leishmaniasis in Portugal. En: *Euroleish IV Workshops. Epidemiology, Health Strategies and Tools in Leishmaniasis, Tunis, Tunisia*. C2: 42.
- Adamson, R.E., Ward, R.D., Feliciangeli, M.D., Maingon, R. (1993). The application of random amplified polymorphic DNA for sandfly species identification. *Medical and Veterinary Entomology*, 7: 203-207.
- Agabian, N. (1990). Trans splicing of nuclear pre-mRNAs. *Cell*, 61:1157-1160.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Berg, D.E. (1992b). PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*, 20: 6221-6225.
- Akopyanz, N., Bukanov, N.O., Westblom, T.U., Kresovich, S., Berg, D.E. (1992a). DNA diversity among clinical isolates of *Helicobacter pylori* detected by PCR-based RAPD fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 20: 5137-5142.
- Al-Hussayni, N.K., Rassam, M.B., Jawdat, S.Z., Wahid, F.N. (1987). Numerical taxonomy of some Old World *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 581-596.
- Aljeboori, T.I., Evans, D.A. (1980a). *Leishmania* spp. in Iraq. Electrophoretic isoenzyme patterns. I. Visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 169-177.
- Aljeboori, T.I., Evans, D.A. (1980b). Leishmaniasis in Iraq. Electrophoresis and isoenzyme patterns. II. Cutaneous leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 178-184.
- Alos, J.I., Lambert, T., Courvalin, P. (1993). Comparison of two molecular methods for tracing nosocomial transmission of *Escherichia coli* K1 in a neonatal unit. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1704-1709.
- Allsopp, B.A., Gibson, W.C., Stagg, D.A. (1985). Characterization of some east african *Theileria* species isolates by isoenzyme analysis, with particular reference to *T. parva*. *International Journal for Parasitology*,

15: 271-276.

- Al-Taqi, M., Evans, D.A. (1978). Characterization of *Leishmania* spp. from Kuwait by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72 : 56-65.
- Altés, J., Salas, A., Riera, M., Udina, M., Galmés, A., Balazat, J., Ballesteros, A., Buades, J., Salvá, F., Villalonga, C. (1991). Visceral leishmaniasis: another HIV-associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. *Aids*, 5: 201-207.
- Alvar, J. (1988). Caracterización molecular de *Leishmania infantum*. Aplicaciones a estudios clínicos y epidemiológicos. *Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid*, 250 pp.
- Alvar, J. (1994). Leishmaniasis and AIDS co-infection: The Spanish example. *Parasitology Today*, 10: 160-163.
- Alvar, J., Ballesteros, J.A., Soler, R., Benito, A., Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Cabrer, B. (1990). Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) infantum*: biochemical characterization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 614-618.
- Alvar, J., Blázquez, J., Nájera, R. (1989a). Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 160: 560-561.
- Alvar, J., Gutiérrez-Solar, B., Molina, R., López-Vélez, R., García-Camacho, A., Martínez, P., Laguna, F., Cercenado, E., Galmes, A. (1992). Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. *Lancet*, 339: 1427.
- Alvar, J., Jiménez, M.I. (1994). Could infected drug-abusers act as potential *L. (L.) infantum* reservoirs?. *Aids*, 8: 854.
- Alvar, J., Mendoza, A., Benito, A., Barker, D.C. (1989b). Characterization of Spanish *Leishmania* isolates with kinetoplast DNA probe. En: EUROLEISH/ECC Congress, Oostende. pp. 11-16.
- Alvar, J., Ortiz, M. (1987). Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Revista Ibérica de Parasitología, Vol. Extra*: 45-50.
- Alvar, J., Verdejo, J., Osuna, A., Nájera, R. (1987). Visceral leishmaniasis in a patient seropositive for HIV. *European Journal of Clinical Microbiology*, 6: 604-606.
- Alves, A.M., Tanuri, A., de Almeida, D.F., von Kruger, W.M. (1993). Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in clones of *Trypanosoma cruzi*. *Experimental Parasitology*, 77: 246-253.
- Andrade, V., Brodskyn, C., Andrade, S.G. (1983). Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 796-799.
- Andrews, B.J., Mentzoni, L., Bjorvatn, B. (1990). Zymodeme conversion of isolates of *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 63-65.
- Andrews, R.H., Chilton, N.H., Mayrhofer, G. (1992a). Selection of specific genotypes of *Giardia intestinalis* by growth *in vitro* and *in vivo*. *Parasitology*, 105: 375-386.
- Andrews, R.H., Handman, E., Adams, M., Baverstock, P.R., Mitchell, G.F. (1988). Genetic characterization of *Leishmania* isolates at 37 enzyme loci. *International Journal for Parasitology*, 18: 445-

452.

Andrews, R.H., Mayrhofer, G., Chilton, N.B., Boreham, P.F.L., Grimmond, T.R. (1992b). Changes in allozyme pattern of the protozoan parasite *Giardia intestinalis*. *International Journal for Parasitology*, 22: 403-406.

Andrews, R.H., O'Donoghue, P., Adams, M., Prowse, S. (1990). Enzyme markers for the genetic characterization of avian *Eimeria* spp. *Parasitology Research*, 76: 627-629.

Angelici, M.C., Gramiccia, M., Gradoni, L. (1989). Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, 99: 301-309.

Anónimo (1991). Aids, leishmaniasis dangers of clash highlighted. *TDR news*, 36: 1, 11.

Antunes, F., Carvalho, C., Tavares, L., Botas, J., Forte, M., del Rio, A.M., Dutschmann, L., Costa, A., Abranches, P., Silva Pereira, C., Paiva, J.E.D., Carvalho Araujo, F., Baptista. (1987). Visceral leishmaniasis recrudescence in a patient with AIDS. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 595.

Arana, M., Evans, D.A., Zolessi, A., Llanos Cuentas, A., Arevalo, J. (1990). Biochemical characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 526-529.

Arias, J.R., Miles, M.A., Naiff, R.D., Póvoa, M.M., de Freitas, R.A., Biancardi, C.B., Castellón, E.G. (1985). Flagellate infections of brazilian sandflies (Diptera:Psychodidae): isolation in vitro and biochemical identification of *Endotrypanum* and *Leishmania*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 1098-1108.

Armijos, R.X., Chico, M.E., Cruz, M.E., Guderian, R.H., Kreutzer, R.D., Berman, J.D., Rogers, M.D., Grögl, M. (1990). Human cutaneous leishmaniasis in Ecuador. Identification of parasites by enzyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 424-428.

Arnot, D.E., Barker, D.C. (1981). Biochemical identification of cutaneous leishmanias by analysis of kinetoplast DNA. II. Sequence homologies in *Leishmania* kDNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 3: 47-56.

Aufauvre-Brown, A., Cohen, J., Holden, D.W. (1992). Use of randomly amplified polymorphic DNA markers to distinguish isolates of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 2991-2993.

Azab, M.E., Rifaat, M.A., Schnur, L.F., Makhoulouf, S.A., El Sherif, E., Salem, A.M. (1984). Canine and rodent leishmanial isolates from Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 263.

Baixench, M.T. (1994). Analyse préliminaire par isoenzymes et RAPD de la variabilité de souches de *Leishmania infantum* isolées chez des patients VIH (+). *Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie. Mémoire de stage*. Université de Lille II, 33 pp.

Bandi, C., La Rosa, G., Comincini, S., Damiani, G., Pozio, E. (1993). Random amplified polymorphic DNA technique for the identification of *Trichinella* species. *Parasitology*, 107: 419-424.

Bañuls, A.L. (1993). Analyse génétique d'isolats naturels sud-américains de *Leishmania* montrant de possibles phénomènes de recombinaison. *Diplôme d'Etudes Approfondies de Parasitologie. Mémoire de stage*. Université de Montpellier II, 37 pp.

- Bañuls, A.L., Guerrini, F., Le Pont, F., Tibayrenc, M. (1994). Analyse génétique d'isolats naturels de *Leishmania* du Pérou et d'Equateur montrant de possibles phénomènes de recombinaison. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Barker, D.C. (1980). The ultrastructure of kinetoplast DNA with particular reference to the interpretation of darkfield electron microscopy images of isolated purified networks. *Micron*, 11: 21-62.
- Barker, D.C. (1987). DNA diagnosis of human leishmaniasis. *Parasitology Today*, 3: 174-184.
- Barker, D.C. (1989a). Molecular approaches to DNA diagnosis. *Parasitology*, 99 (Suppl.): S125-S146.
- Barker, D.C. (1989b). Assessment of the use in the diagnosis of leishmaniasis of biotinylated kinetoplast derived DNA sequences. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 503-513, Plenum Press, New York.
- Barker, D.C., Arnot, D.E., Butcher, J. (1982). DNA characterization as a taxonomic tool for identification of kinetoplastic flagellate protozoans. En: *Biochemical characterization of Leishmania*. pp. 138-180. Ed. Chance and Walton. UNDOP/World Bank/WHO. Geneva.
- Barker, D.C., Butcher, J. (1983). The use of DNA probes in the identification of leishmanias: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 285-297.
- Barker, D.C., Butcher, J., Gibson, L.J., Kennedy, W.P.K., Williams, R.H., Cuba-Cuba, C.A., Marsden, P.D., Lainsom, R., Shaw, J.J. (1986c). Sequence homology of kinetoplast DNA in *Leishmania* studied by filter hybridization of endonuclease digested fragments and "in situ" hybridization of individual organisms. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS INSERM, 1984) (Rioux J.A., ed.), pp. 41-55. IMEEE, Montpellier.
- Barker, D.C., Butcher, J., Gibson, L.J., Williams, R.H. (1986a). Characterization of *Leishmania* sp. by DNA hybridization probes. UNDP/World Bank/WHO/TDR. *Laboratory Manual* 57 pp.
- Barker, D.C., Gibson, L.J., Kennedy, W.P.K. (1986b). The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. *Parasitology*, 91 (Suppl.): S139-S174.
- Barker, R.H. Jr. (1990). DNA probe diagnosis of parasitic infections. *Experimental Parasitology*, 70: 494-499.
- Barnabé, C., Tibayrenc, M. (1994). Variabilité génétique de *Trypanosoma cruzi* agent de la maladie de Chagas. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Barr, S.C., Dennis, V.A., Klei, T.R. (1990). Growth characteristics in axenic and cell cultures, protein profiles, and zymodeme typing of three *Trypanosoma cruzi* isolates from Louisiana mammals. *Journal of Parasitology*, 76: 631-638.
- Barral, A., Badaró, R., Barral-Netto, M., Grimaldi, Jr., G., Momem, H., Carvalho, E.M. (1986). Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of american visceral leishmaniasis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35: 732-734.
- Barral, V., This, P., Imbert-Establet, D., Combes, C., Delseny, M. (1993). Genetic variability and evolution of the *Schistosoma* genome analysed by using random amplified polymorphic DNA markers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 59: 211-222.

- Bastien, P. (1990). Étude des caryotypes moléculaires de *Leishmania*. Analyse du polymorphisme au sein du complexe *Leishmania infantum*. Mécanismes et implications possibles. Thèse pour le Doctorat en Sciences Biologiques (Parasitologie). Université Montpellier II. 182 pp.
- Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M. (1992a). *Leishmania*: Sex, lies and karyotype. *Parasitology Today*, 8: 174-177.
- Bastien, P., Blaineau, C., Pagès, M. (1992b). Molecular karyotype analysis in *Leishmania*. En: *Subcellular Biochemistry, Volume 18: Intracellular Parasites* (Avilla, J.L y Harris, J.R. eds). Plenum Press, New York.
- Bastien, P., Blaineau, C., Taminh, M., Rioux, J.A., Roizès, G., Pagès, M. (1990a). Interclonal variations in molecular karyotype in *Leishmania infantum* imply a "mosaic" strain structure. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 40: 53-62.
- Bastien, P., Pagès, M., Blaineau, C. (1990b). Chromosomal polymorphisms in *Leishmania infantum*: a study of the molecular karyotypes by pulsed field gel electrophoresis (PFGE). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 453.
- Bastrenta, B., Katarzyna, L., Tibayrenc, M. (1994). Étude de la diversité génétique chez *Trypanosoma cruzi* par deux séries indépendantes de marqueurs génétiques: isoenzymes et RAPD. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Belazzoug, S. (1984). La leishmaniose en Algérie à travers l'identification des souches. *Abstracts of the International Colloquium on Taxonomy and Phylogeny of Leishmania*, Montpellier (France).
- Belazzoug, S. (1986a). *Leishmania infantum*, causative organism of visceral leishmaniasis at Biskra (Algeria). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 1002.
- Belazzoug, S. (1986b). Les leishmanioses en Algérie. A propos de l'identification enzymatique de 32 souches d'origine humaine et animale. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 397-400. IMEEE, Montpellier, France.
- Belazzoug, S., Ammar-Khodja, A., Pratlong, F., Rioux, J.A. (1992). *Leishmania major* MON-117, agent de la leishmaniose cutanée en Mauritanie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67: 62.
- Belazzoug, S., Ammar-Khodja, A., Rioux, J.A., Pratlong, F. (1986). Forme chronique de leishmaniose cutanée humaine à *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914. L'homme réservoir éventuel. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 459-461. IMEEE, Montpellier, France.
- Belazzoug, S., Lanotte, G., Maazoun, R., Pratlong, F., Rioux, J.A. (1985). Un nouveau variant enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent de la leishmaniose cutanée du nord de l'Algérie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 1-3.
- Ben Abderrazak, S. (1993). Variabilité génétique des populations de *Plasmodium falciparum*. PHD dissertation, Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier, France.
- Ben-Ismaïl, R., Gramiccia, M., Gradoni, L., Ben Said, M., Ben Rachid, M.S. (1986). Identificazione biochimica di isolati di *Leishmania* dalla Tunisia. *XIV Congresso Nazionale della Società Internazionale di Parassitologia*, Pisa (Italia).
- Ben-Ismaïl, R., Smith, D.F., Ready, P.D., Ayadi, A., Gramiccia, M., Ben-Osman, A., Ben-Rachid, M. (1992). Sporadic cutaneous leishmaniasis in north Tunisia: identification of the causative agent as *Leishmania*

- infantum* by the use of a diagnostic deoxyribonucleic acid probe. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 508-510.
- Benne, R., De Vries, B., Van den Burg, J., Klaver, B. (1983). The nucleotide sequence of a segment of *Trypanosoma brucei* mitochondrial maxicircle DNA that contains the gene for apocytochrome b and some unusual unassigned reading frames. *Nucleic Acids Research*, 11: 6925-6941.
- Berenguer, J., Moreno, S., Cercenado, E., Bernaldo de Quirós, J., García de la fuente, A., Bouza, E. (1989). Visceral Leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Annals of Internal Medicine*, 111: 129-132.
- Bernard, E., Rodot, S., Michiels, J.F., Politano, S., Le Fichoux, Y., Dellamonica, P. (1988). Leishmaniose viscérale au cours du syndrome immunodéficitaire acquis. *La Presse Médicale*, 17: 872.
- Bernards, A., Michels, P.A.M., Lincke, C.R., Borst, P. (1983). Growth of chromosome ends in multiplying trypanosomes. *Nature*, 303: 592-597.
- Bertram, M.A., Meyer, E.A., Lile, J.D., Morse, S.A. (1983). A comparison of isozymes of five axenic *Giardia* isolates. *Journal of Parasitology*, 69: 793-801.
- Bettini, S., Gradoni, L., Pozio, E. (1978). Isolation of *Leishmania* strains from *Rattus rattus* in Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72:441-442.
- Bettini, S., Gramiccia, M., Gradoni, L., Atzeni, M.C. (1986). Leishmaniasis in Sardinia: II. Natural infection of *Phlebotomus perniciosus* Newstead 1911, by *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, in the province of Cagliari. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 458-459.
- Bettini, S., Pozio, E., Gradoni, L. (1980). Leishmaniasis in Tuscany (Italy): (II) *Leishmania* from wild Rodentia and Carnivora in a human and canine leishmaniasis focus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 77-83.
- Beverley, S.M. (1988). Characterization of the "unusual" mobility of large circular DNAs in pulse field-gradient electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 16: 925-939.
- Beverley, S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annual Reviews of Microbiology*, 45: 417-444.
- Beverley, S.M., Coburn, C.M. (1990). Recurrent de novo appearance of small linear DNAs in *Leishmania major* and relationship to extra-chromosomal DNAs in other species. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 42: 133-142.
- Beverley, S.M., Coderre, J.A., Santi, D.V., Schimmke, R.T. (1984). Unstable DNA amplifications in methotrexate-resistant *Leishmania* consist of extrachromosomal circles which relocalize during stabilization. *Cell*, 38: 431-439.
- Bingen, E., Boissinot, C., Desjardins, P., Cavé, H., Brahimi, N., Lambert-Zechovsky, N., Denamur, E., Blot, P., Elion, J. (1993a). Arbitrarily primed polymerase chain reaction provides rapid differentiation of *Proteus mirabilis* isolates from a pediatric hospital. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1055-1059.
- Bingen, E., Cavé, H., Aujard, Y., Lambert-Zechovsky, N., Desjardins, P., Elion, J., Denamur, E. (1993b). Molecular analysis of multiply recurrent meningitis due to *Escherichia coli* K1 in an infant. *Clinical Infectious Diseases*, 16: 82-85.
- Bishop, R.P. (1990). Extensive homologies between *Leishmania donovani* chromosomes of markedly different size. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 38: 1-12.

- Bishop, R.P., Akinsehinwa, F. (1989). Characterization of *Leishmania donovani* stocks by genomic DNA heterogeneity and molecular karyotype. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 629-634.
- Bishop, R.P., Miles, M.A. (1987). Chromosome size polymorphisms of *Leishmania donovani*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24: 263-272.
- Bishop, R.P., Miles, M.A. (1989). Karyotype analysis of *Leishmania donovani*. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 917-923, Plenum Press. New York.
- Blackwell, J.M. (1992). Leishmaniasis epidemiology: all down to the DNA. *Parasitology*, 104: S19-S34.
- Blaineau, C., Bastien, P., Pagès, M. (1990). Karyotypic time evolution of *Leishmania* strains in a restricted area. En: *VII Congrès International de Parasitologie: Résumés*, abstract n°. S1 C3) *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 8 (Suppl. 1): 35.
- Blaineau, C., Bastien, P., Pagès, M. (1992a). Multiple forms of chromosome I, II and IV in a restricted population of *Leishmania infantum* contrasting with monomorphism in individual strains suggest haploidy or automixy. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50: 197-204.
- Blaineau, C., Bastien, P., Pagès, M. (1992b). Genetic exchange in a well defined population ?. En: *Third Euroleish Workshops Biochemistry, Immunology and Molecular Biology of Leishmania*. Abstracts n°. D3: 31.
- Blaineau, C., Bastien, P., Rioux, J.A., Roizès, G., Pagès, M. (1991). Long-range restriction maps of size-variable homologous chromosomes in *Leishmania infantum*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46: 293-302.
- Blanc, D., Nicholls, R., Sargeant, P.G. (1989). Experimental production of news zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 787-790.
- Blanc, D., Sargeant, P.G. (1991). *Entamoeba histolytica* zymodemes: exhibition of γ and δ bands only of glucose phosphate isomerase and phosphoglucosmutase may be influenced by starch content in the medium. *Experimental Parasitology*, 72: 87-90.
- Blázquez, J., Alvar, J., Nájera, R. (1987). Leishmaniasis in a HIV (LAV/HTLV III) serologically positive patient. *Journal of Infection*, 14: 89-90.
- Bogliolo, A.R., Godfrey, D.G. (1987). Isoenzyme changes during the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 222-229.
- Boid, R. (1988). Isoenzyme characterisation of 15 stocks of *Trypanosoma evansi* isolated from camels in the Sudan. *Tropical Medicine and Parasitology*, 39: 45-50.
- Bonfante-Garrido, R. (1980). New subspecies of leishmaniasis isolated in Venezuela. *Xth International Congress of Tropical Medicine and Malaria*, Manila. p. 203.
- Borst, P. (1991). Why kinetoplast DNA ?. *Networks Trends Genetic*, 7: 139-141.
- Borst, P., Hoeijmakers, J. (1979). Kinetoplast DNA. *Plasmid*, 2: 20-40.
- Borzoni, F., Gradoni, L., Gramiccia, M., Maccioni, A., Valdes, E., Loddo, S. (1991). A case of lingual and palatine localization of a viscerotropic *Leishmania infantum* zymodeme in Sardinia, Italy. *Tropical Medicine and Parasitology*, 42: 193-194.

- Botet, J., Portús, M. (1993). La leishmaniosis en la España peninsular. Revisión histórico- bibliográfica (1912-1985). *Revista de Sanidad e Higiene Pública*, 67: 255-266.
- Bowles, J., McManus, D.P. (1993). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57: 231-240.
- Braga, R.R., Lainson, R., Shaw, J.J., Ryan, L., Silveira, F.T. (1986). Leishmaniasis in Brazil. XXII: Characterization of *Leishmania* from man, dogs and the sandfly *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912) isolated duringg an outbreak of visceral leishmaniasis in Santarém, Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 143-145.
- Brenière, S.F., Braquemon, P., Solari, A., Agnès, J.F., Tibayrenc, M. (1991). An isoenzyme study of naturally occurring clones of *Trypanosoma cruzi* isolated from both sides of the West Andes highland. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 62-66.
- Brenière, S.F., Carrasco, R., Antezana, G., Desjeux, P., Tibayrenc, M. (1989). Association between *Trypanosoma cruzi* and specific humoral depression in chronic chagasic patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 517.
- Briones, M.C.S., Nelson, K., Beverley, S.M., Affonso, H.T., Camargo, E.P., Floeter-Winter, L.M. (1992). *Leishmania tarentolae* taxonomic relatedness inferred from phylogenetic analysis of the small subunit ribosomal RNA gene. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52: 121-128.
- Bullini, L. (1984). Enzyme variants in the identification of parasites and vectors: methodological aspects of the electrophoretic approach. En: *New approaches to the identification of parasites and their vectors. Tropical Diseases Research Series No. 5. Proceedings of a Symposium on Application of Biochemical and Molecular Biology Techniques to Problems of Parasite and Vector Identification held in Geneva*. pp. 53-69, (Newton, B.N., Michal, F. eds.). Geneva, Switzerland.
- Bustamante, C., Gurrieri, S., Smith, S.B. (1993). Towards a molecular description of pulsed-field gel electrophoresis. *Trens in Biohecnology*, 11: 23-30.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J., Gresshoff, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Biotechnology*, 9: 553-556.
- Camargo, E.P., Mattei, D.M., Barbieri, C.L., Morel, C.M. (1982). Electrophoretic analysis of endonuclease-generated fragments of k-DNA, of esterase isoenzymes, and of surface proteins as aids for species identification of insect trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 29: 251-258.
- Camargo, E.P., Sbravate, C., Teixeira, M.M.G., Uliana, S.R.B., Soares, M.B.M., Affonso, H.T., Floeter-Winter, L. (1992). Ribosomal DNA restriction analysis and synthetic oligonucleotide probing in the identification of genera of lower trypanosomatids. *Journal of Parasitology*, 78: 40-48.
- Campbell, J.D., Faubert, G.M. (1994). Comparative studies on *Giardia lamblia* encystation in vitro and in vivo. *Journal of Parasitology*, 80: 36-44.
- Campbell, D.A., Thornton, D.A., Boothroyd, J.C. (1984). Apparent discontinuous transcription of *Trypanosoma brucei* variant surface antigen gene. *Nature*, 311: 350-355.
- Campino, L., Santos-Gomes, G., Pratlong, F., Dedet, J.P., Abranches, P. (1994). HIV-*Leishmania* co-infection in Portugal: isolation of *Leishmania infantum* MON-24. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 394.
- Cancilla, M.R., Powell, I.B., Hillier, A.J., Davidson, B.E. (1992). Rapid genomic fingerprinting of *Lactococcus lactis* strains by arbitrarily primed polymerase chain reaction with ³²P and fluorescent labels.

- Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1772-1775.
- Carle, G.F., Frank, M., Olson, M.V. (1986). Electrophoretic separations of large DNA molecules by periodic inversion of the electric field. *Science*, 232: 65-68.
- Carle, G.F., Olson, M.V. (1984). Separation of chromosomal DNA molecules from yeast by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 12: 5647-5664.
- Carle, G.F., Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 82: 3756-3760.
- Carneiro, M., Romanha, A.J., Chiari, E. (1991). Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86: 387-393.
- Carson, C.A., Brant, H.M., Jensen, J.B., Bailey, C.W., Allen, G.K. (1994). Use of random amplified polymorphic DNA analysis to compare *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* isolates. *Parasitology Research*, 80: 312-315.
- Carter, R. (1978). Studies on enzyme variation in the murine malaria parasites *Plasmodium berghei*, *P. yoelii*, *P. vinckei* and *P. chabaudi* by starch gel electrophoresis. *Parasitology*, 76: 241-267.
- Carter, R., Voller, A. (1973). Enzyme typing of malaria parasites. *British Medical Journal*, 1: 149-150.
- Carter, R., Voller, A. (1975). The distribution of enzyme variation in populations of *Plasmodium falciparum* in Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 69: 371-376.
- Carter, R., Walliker, D. (1977). Biochemical markers for strain differentiation in malarial parasites. *Bulletin of the World Organization*, 55: 339-345.
- Cedillo-Rivera, R., Enciso-Moreno, J.A., Martínez-Palomo, A., Ortega-Pierres, G. (1989). *Giardia lamblia*: isoenzyme analysis of 19 axenic strains isolated from symptomatic and asymptomatic patients in Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 644-646.
- Centers for Disease control (1986). Classification system for human T-lymphotropic virus type III/lymphadenopathy-associated virus infections. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, 35: 334-339.
- Centers for Disease Control (1987). Classification system for HIV infection in children under 13 years of age. *Morbidity and Mortality Weekly Reports*, 36: 225-236.
- Cibulskis, R.E. (1988). Origins and organization of genetic diversity in natural populations of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology*, 86: 303-322.
- Cibulskis, R.E. (1992). Genetic variation in *Trypanosoma brucei* and the epidemiology of sleeping sickness in the Lambwe Valley, Kenya. *Parasitology*, 104: 99-109.
- Clark, C.G., Cunnick, C.C., Diamond, L.S. (1992). *Entamoeba histolytica*: Is conversion of "nonpathogenic" amebae to the "Pathogenic" form a real phenomenon?. *Experimental Parasitology*, 74: 307-314.
- Clauvel, J.P., Couderc, L.J., Belmin, J., Daniel, M.T., Rabian, C., Seligmann, M. (1986). Visceral leishmaniasis complicating acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 1010.
- Coderre, J.A., Beverley, S.M., Schimke, R.T., Santi, D.V. (1983). Overproduction of a bifunctional thymidylate synthetase dihydrofolate reductase and DNA amplification in methotrexate-resistant *Leishmania*

- tropica. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80: 2132-2136.
- Comeau, A.M., Miller, S.I., Wirth, D.F. (1986). Chromosome location of four genes in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 21: 161-169.
- Comes, A.M., Jacquiet, P., Humbert, J.F., Cabaret, J. (1994). Étude de la variabilité morphologique, écologique et génétique des *Haemonchinae* parasites de ruminants en Mauritanie. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Condom, M.J., Clotet, B., Sirera, G., Milla, F., Foz, M. (1989). Asymptomatic Leishmaniasis in the acquired immunodeficiency syndrome (AIDS). *Annals of Internal Medicine*, 111: 767-768.
- Corredor, A., Kreutzer, R.D., Tesh, R.B., Boshell, J., Palau, M.T., Cácers, E., Duque, S., Pelaez, D., Rodríguez, G., Nichols, S., Hernández, C.A., Morales, A., Young, D.G., Ferro de Carrasquilla, C. (1990). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 205-214.
- Creasey, A., Fenton, B., Walker, A., Thaithong, S., Salma Oliveira, Mutambu, S., Walliker, D. (1990). Genetic diversity of *Plasmodium falciparum* shows geographical variation. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 403-413.
- Cruz, A., Beverley, S.M. (1990). Gene replacement in parasitic protozoa. *Nature*, 348: 171-173.
- Cuba Cuba, C.A., Marsden, P.D., Barreto, A.C., Roitman, I., Vexenat, A., de Lima, L.M.P., de Sa, M.H.P. (1984). Identification of human stocks of *Leishmania* spp. isolated from patients with mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 708-709.
- Cuba Cuba, C.A., Miles, M.A., Vexenat, A., Barker, D.C., McMahon Pratt, D., Butcher, J., Barreto, A.C., Marsden, P.D. (1985). A focus of mucocutaneous leishmaniasis in Três Braços, Bahia, Brazil: characterization and identification of *Leishmania* stocks isolated from man and dogs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 500-507.
- Czajka, J., Bsat, N., Piani, M., Russ, W., Sultana, K., Wiedmann, M., Whitaker, R., Batt, C.A. (1993). Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 304-308.
- Chacón, M.R., Rodríguez, E., Parkhouse, R.M.E., Burrows, P.R., Gárate, T. (1994). The differentiation of parasitic nematodes using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Helminthology*, 68: 109-113.
- Chadee, R., Smith, J.M., Meerovitch, E. (1985). *Entamoeba histolytica*: electrophoretic isoenzyme patterns of strains and their virulence in the cecum of gerbils (*Meriones unguiculatus*). *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 870-878.
- Challberg, S.S., Englund, P.T. (1980). Heterogeneity of minicircles in kinetoplast DNA of *Leishmania tarentolae*. *Journal of Molecular Biology*, 138: 447-472.
- Chance, M.L. (1985). The biochemical and immunological taxonomy of *Leishmania*. En: *Biology of Leishmania and leishmaniasis*. (Chang/Bray, eds.), p. 16, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam).
- Chance, M.L. (1986). The nomenclature of enzyme variants with particular reference to parasite protozoa. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (*Coll. int. CNRS INSERM, 1984*) (Rioux J.A., ed.), pp. 85-89. IMEEE, Montpellier.

- Chance, M.L., Peters, W., Shchory, L. (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania*. I. Observation on DNA. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68: 307-316.
- Chance, M.L., Schunr, L.F., Thomas, S.C., Peters, W. (1978). The biochemical and serological taxonomy of *Leishmania* from the aethiopian zoogeographical region of Africa. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*, 72: 535-542.
- Chance, M.L., Walton, B.C. Eds. (1982). Biochemical characterization of *Leishmania*. pp. 275 . UNDP/World Bank/WHO: Geneva.
- Chang, K.P., Fong, D., Bray, R.S. (1985). En: Biology of *Leishmania* and leishmaniasis. En: *Leishmaniasis*. (Chang/Bray, eds.), p. 16, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam).
- Chang, K.P., Hendricks, L.D. (1985). Laboratory cultivation and maintenance of *Leishmania*. En: *Leishmaniasis*. (Chang/Bray, eds.), pp. 213-244, Elsevier Science Publishers B.V. (Amsterdam).
- Chapman, C.J., Kennedy, W.P.K., Evans, D.A. (1989). Kinetoplast DNA probes for the identification of the Old World cutaneous leishmaniasis. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 549-554, Plenum Press. New York.
- Chu, G., Wollrath, D., Davis, R.W. (1986). Separation of large DNA molecules by contour-clamped homogeneous electric fields. *Science*, 234: 1582-1585.
- Chung, I.K., Armstrong, T.C., Patterson, J.L. (1994). Identification of a short viral transcript in *Leishmania* RNA virus-infected cells. *Virology*, 198: 552-556.
- Daggett, P.M., Nerad, T.A. (1983). The biochemical identification of vahlkampfiid amoebae. *Journal of Protozoology*, 30: 126-128.
- Dams, E., Hendriks, L., Van der Peer, Y., Smits, N.J-M., Vandenbempt, I., De Wachter, R. (1988). Compilation of small ribosomal subunit RNA sequences. *Nucleic Acids Research*, 16: r87-r173.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1987). Differentiation iso-enzymatique de 7 souches de *Toxoplasma gondii* par iso-electrofocalisation en gel de polyacrylamide. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* 5: 33-39.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1988a). Analyse iso-enzymatique de souches clonées de *Toxoplasma gondii*. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 6: 41-46.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1988b). Isoenzymic characterization of seven strains of *Toxoplasma gondii* by isoelectrofocusing in polyacrilamide gels. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39: 551-558.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1990). Comparison of isoenzyme profiles of *Toxoplasma gondii* tachyzoites produced under different culture conditions. *Parasitology Research*, 76: 367-371.
- Dardé, M.L., Bouteille, B., Pestre-Alexandre, M. (1992). Isoenzyme analysis of 35 *Toxoplasma gondii* isolates and the biological and epidemiological implications. *Journal of Parasitology*, 78: 786-794.
- Das Gupta, S., Ghosh, D.K., Majumder, H.K. (1991). A cloned kinetoplast DNA mini-circle fragment from a *Leishmania* spp. specific for post-kala-azar dermal leishmaniasis strains. *Parasitology*, 102: 187-191.
- Datry, A., Simmilowski, T., Jais, P., Rosenheim, M., Katlama, C., Maheu, E., Kazar, S., Fassin, D., Danis, M., Gentilini, M. (1990). AIDS-associated leishmaniasis: an unusual gastro-duodenal presentation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 239-240.

- Dawkins, H.J.S. (1987). Molecular weight separation of very large DNA. *Parasitology Today*, 3: 60-62.
- Dawkins, H.J.S. (1989). Large DNA separation using field alternation agar gel electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 492: 615-639.
- Dawkins, H.J.S., Ferrier, D.J., Spencer, T.L. (1987). Field inversion gel electrophoresis (FIGE) in vertical slabs as an improved method for large DNA separation. *Nucleic Acids Research*, 15: 3634-3635.
- Dedet, J.P. (1990). Cutaneous leishmaniasis in French Guiana: a review. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 25-28.
- Dedet, J.P. (1993). *Leishmania* et leishmanioses du continent américain. *Annales de l'Institut Pasteur*, 4: 3-25.
- Dedet, J.P., Pajot, F.X., Desjeux, P., Goyot, P., Chippaux, J.P., Geoffroy, B. (1985). Natural host of *Leishmania mexicana amazonensis* Laison and Shaw, 1972 (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in French Guiana. *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 302-305.
- Dedet, J.P., Pratlong, F., Martini, A., Lefevre, M., Dereure, O. (1994). *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* en Guyane française: une réalité à prendre en considération. *Les Nouvelles Dermatologiques*, 13: 188-189.
- Dedet, J.P., Sařjanova, V.M., Le Blancq, S.M., Desjeux, P., Schnur, L.F., Emelyanova, L.P., Chance, M. (1986). Caractérisation de souches de *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914 isolés du Senegal (Afrique de l'Ouest). Corollaires taxonomiques et épidémiologiques. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 463-469. IMEEE, Montpellier, France.
- De Jonckheere, J.F. (1983). Isoenzyme and total protein analysis by agarose isoelectric focusing and taxonomy of the genus *Acanthamoeba*. *Journal of Protozoology*, 30: 701-706.
- De la Loma, A., Alvar, J., Martínez Galiano, E., Blázquez, J., Alcalá Muñoz, A., Nájera, R. (1985). Leishmaniasis or Aids?. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 421.
- De Luca D'Oro, G.M., Gardenal, C.N., Perret, B., Crisci, J.V., Montamat, E.E. (1993). Genetic structure of *Trypanosoma cruzi* populations from Argentina estimated from enzyme polymorphism. *Parasitology*, 107: 405-410.
- Dellamonica, P., Bernard, E., Le Fichoux, Y., Politano, S., Carles, M., Durand, J., Mondain, V. (1989). Allopurinol for treatment of visceral leishmaniasis in patients with AIDS. *Journal of Infectious Diseases*, 160: 904-905.
- Dereure, J., Vélez, I.D., Pratlong, F., Denial, M., Lardi, M., Moreno, G., Serres, E., Lanotte, G., Rioux, J.A. (1986). La leishmaniose viscérale autochtone au Maroc méridional. Présence de *Leishmania infantum* MON-1 chez le Chien en zone présaharienne. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 421-425. IMEEE, Montpellier, France.
- Desjeux, P. (1991). En: *Information on the Epidemiology and Control of the Leishmaniases by Country or Territory*. Geneva: World Health Organization. WHO/LEIS/91.30.
- Desjeux, P., Bray, R.S., Dedet, J.P., Chance, M.L. (1981). Differentiation of canine and cutaneous leishmaniasis strains in Senegal. *Transactions of the Royal Tropical Society of Medicine and Hygiene*, 76: 132-133.
- Desjeux, P., Dedet, J.P. (1989). Isoenzyme characterization of 112 *Leishmania* isolates from French Guiana.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 83: 610-612.

Desjeux, P., Mollinedo, S., Le Pont, F., Paredes, A., Ugarte, G. (1987). Cutaneous leishmaniasis in Bolivia. A study of 185 human cases from Alto Beni (La Paz Department). Isolation and isoenzyme characterization of 26 strains of *Leishmania brasiliensis brasiliensis*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 742-746.

Desjeux, P., Mollinedo, S., Le Pont, F., Tibayrenc, M. (1986a). Les *Leishmania* de Bolivie I. *Leishmania brasiliensis* Vianna, 1911 dans les Départements de la Paz et du Béné. Premiers isolements de souches d'origine humaine. Caractérisation enzymatique. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 401-410. IMEEE, Montpellier, France.

Desjeux, P., Mollinedo, S., Le Pont, F., Tibayrenc, M. (1986b). Les *Leishmania* de Bolivie II. *Leishmania chagasi* Cunha et Chagas, 1937. Premiers isolements dans les "yungas" du département de la Paz. Comparaison isoenzymatique de souches de l'homme, du chien et du *Phlébotome Lutzomyia longipalpis* (Lutz et Nerva, 1912). En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 411-419. IMEEE, Montpellier, France.

Detke, S., Chaudhuri, G., Kink, J.A., Chang, P. (1988). DNA amplification in tuncycamicin resistant *L. mexicana*. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 3418-3424.

De Vasquez, A.M., Saenz, R.E., Petersen, J.L., Christensen, H.A., Johnson, C.M. (1990). *Leishmania mexicana* complex: human infections in the republic of Panamá. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 619-622.

Dias Neto, E., Pereira de Souza, C., Rollinson, D., Katz, N., Pena, S.D.J., Simpson, A.J.G. (1993). The random amplification of polymorphic DNA allows the identification of strains and species of schistosome. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57: 83-88.

Dooris, P.M., McGhee, R.B. (1976). Immunologic and electrophoretic characteristics of two species of *Crithidia*. *Journal of Protozoology*, 23: 433-437.

Du, Y., Chang, K-P. (1994). Phylogenetic heterogeneity of three *Crithidia* spp. vs. *Crithidia fasciculata*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 66: 171-174.

Dujardin, J.C., Gajendran, N., Arevalo, J., Llanos-Cuentas, A., Guerra, H., Gómez, J., Arroyo, J., de Doncker, S., Jacquet, D., Hamers, R., Le Ray, D. (1993a). Karyotype polymorphism and conserved characters in *Leishmania (Viannia) brasiliensis* complex explored with chromosome-derived probes. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 73: 101-118.

Dujardin, J.C., Gajendran, N., Hamers, R., Matthijsen, G., Urjel, R., Recacoechea, M., Villaroel, G., Bermudez, H., Desjeux, Ph., De Doncker, S., Le Ray, D. (1989). Leishmaniasis in the Lowland of Bolivia (Leishbol): Part VIII. Characterization and identification of Bolivian isolates by PFG karyotyping. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 137-148. Plenum Press. New York.

Dujardin, J.C., Llanos-Cuentas, A., Cáceres, A., Arana, M., Dujardin, J.P., Guerrini, F., Gómez, J., Arroyo, J., de Doncker, S., Jacquet, D., Hamers, R., Guerra, H., Le Ray, D., Arévalo, J. (1993b). Molecular karyotype variation in *Leishmania (Viannia) peruviana*: indication of geographical populations in Peru distributed along a north-south cline. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 87: 335-347.

Dupouy-Camet, J.; Robert, F., Guillou, J.P., Vallet, C., Perret, C., Soulé, C. (1994b). Identification of *Trichinella* isolates with random amplified polymorphic DNA markers. *Parasitology Research*, 80: 358-360.

- Dupouy-Camet, J.; Robert, F., Soulé, C. (1994a). Typage par RAPD de souches de *Trichinella*. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Ebert, F. (1987). Isoenzyme studies on *Leishmania* stocks from Peru by ultrathin-layer isoelectrofocusing. *Tropical Medicine and Parasitology*, 38: 37-40.
- El-Hassan, A.M., Zijlstra, E.E., Meredith, S.E.O., Ghalib, H.W., Ismail, A. (1993). Identification of *Leishmania donovani* using a polymerase chain reaction from an area of endemic kala-azar in the Sudan. *Acta Tropica*, 55: 87-90.
- Ellis, J.T., Crampton, J.M. (1986). Isolation of kinetoplast DNA probes for the identification of *Leishmania donovani*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 336.
- Ellenberger, T.E., Beverley, S.M. (1989). multiple drug resistance and conservative amplification of the H region in *Leishmania major*. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 15094-15103.
- Englund, P.T. (1978). The replication of kinetoplast DNA networks in *Crithidia fasciculata*. *Cell*, 14: 157-168.
- Englund, P.T. (1979). Free minicircles of kinetoplast DNA in *Crithidia fasciculata*. *Journal of Biological Chemistry*, 254: 4895-4900.
- Englund, P.T., Marini, J.C. (1980). The replication of kinetoplast DNA. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 1064-1069.
- Eperon, I.C., Janssen, J.W.G., Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P. (1983). The major transcripts of the kinetoplast DNA of *Trypanosoma brucei* are very small ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Research*, 11: 105-125.
- Eresh, S., Mendoza-León, A., Barker, D.C. (1993). A small chromosome of *Leishmania (Viannia) braziliensis* contains multicopy sequences which are complex specific. *Acta Tropica*, 55: 33-46.
- Evans, D.A., Godfrey, D., Lanham, S., Lanotte, G., Modabber, F., Schnur, L. (1989b). characterization of *Leishmania*. En: *Handbook on isolation characterization and cryopreservation of Leishmania*. (Evans, D.A. ed.), pp. 1-45. Geneva, Switzerland.
- Evans, D.A., Kennedy, W.P.K., Elbihari, S., Chapman, C.J., Smith, V., Peters, W. (1987). Hybrid formation within the genus *Leishmania*?. *Parassitologia*, 29: 165-173
- Evans, D.A., Lanham, S.M., Baldwin, C.L., Peters, W. (1984). The isolation and isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* subsp. from patients with cutaneous leishmaniasis acquired in Belize. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 35-42.
- Evans, D.A., Smith, V., Killick-Kendrick, R., Neal, R.A., Peters, W. (1989a). Evidence for hybrid formation in the genus *Leishmania*. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 685-690, Plenum Press. New York.
- Fairlamb, A.H., Weislogel, P.O., Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P. (1978). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Biology*, 76: 293-309.
- Fang, F.C., McClelland, M., Guiney, D.G., Jackson, M.M., Hartstein, A.I., Morthland, V.H., Davis, C.E., McPherson, D.C., Welsh, J. (1993). Value of molecular epidemiologic analysis in a nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* outbreak. *Journal of the American Medical Association*, 270: 1323-1328.

- Farri, T.A., Sargeant, P.G., Warhurst, D.C., Williams, J.E., Bhojnani, R. (1980). Electrophoretic studies of the hexokinase of *Entamoeba histolytica* groups I to IV. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 672-673.
- Feinberg, A.P.; Volgestein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 132: 6-13.
- Feinberg, A.P.; Volgestein, B. (1984). Addendum "A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry*, 137: 257-266.
- Fernandes, O., Degrove, W., Campbell, D.A. (1993). The mini-exon gene: a molecular marker for *Endotrypanum schaudinni*. *Parasitology*, 107: 219-224.
- Fernandes, O., Murthy, V.K., Degrove, W.M., Campbell, D.A. (1992). Mini-exon gene as a tool to analyse *Leishmania* species. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (suppl. II): 113.
- Fernández, A.P., Nelson, K., Beverley, S.M. (1993). Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: Perspectives on the age and origins of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 11608-11612.
- Fernández, M.A., Muñoz-Fernández, M.A., Fresno, M. (1993). Mecanismos de evasión inmune por protozoos parásitos. En: *Parasitología Molecular. Colección Nuevas Tendencias vol. 24*: 247-270.
- Fernández-Guerrero, M.L., Aguado, J.M., Buzón, L., Barros, C., Montalbán, C., Martín, T., Bouza, E. (1987). Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *American Journal of Medicine*, 83: 1098-1102.
- Fouts, D.L., Wolstenholme, D. (1979). Evidence for a partial transcript of the small circular component of kinetoplast DNA of *Criothidia acanthocephali*. *Nucleic Acids Research*, 6: 3785-3804.
- Frank, C., Hadziandoniou, M., Pratlong, F., Garifallou, A., Rioux, J.A. (1993). *Leishmania tropica* and *Leishmania infantum* responsible for cutaneous leishmaniasis in Greece: sixteen autochthonous cases. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 184-185.
- Franke, E.D., Lucas, C.M., Tovar, A.A., Kruger, J.H., Seminario de Rivera, M.V., Wignall, F.S. (1990). Diffuse cutaneous leishmaniasis acquired in Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 43: 260-262.
- Frasch, A.C.C., Goijman, S.G., Cazzulo, J.J., Stoppani, A.O.M. (1981). Constant and variable regions in DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*: application to species and stock differentiation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 4: 163-170.
- Freese, J.A., Markus, M.B. (1990). Enzyme typing of southern African isolates of *Plasmodium falciparum* by polyacrylamide gel electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 519-520.
- Gajendran, N., Dujardin, J.L., Le Ray, D., Matthyssens, C., Muyldermans, S., Hammers, R. (1989). Abnormally migrating chromosome identifies *Leishmania donovani* populations. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 539-547, Plenum Press, New York.
- Galindo, I., Ramírez, J.L. (1989). Study of *Leishmania mexicana* electrokaryotype by clamped homogeneous electric field electrophoresis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34: 245-252.
- Galofré, J., Miró, J.M., Mallolas, J., García-Ruz, F., Grau, J.M. (1990). Leishmaniasis visceral en pacientes infectados por el VIH en el área de Barcelona. *Revista Clínica Española*, 187: 98-99.

- Gállego, J., Fisa, R., Rioux, J.A., Pratlong, F., Guilvard, E., Gállego, J., Riera, C., Juncosa, T., Portús, M. (1993). Los zimodemas de *Leishmania infantum* en la comarca del priorato. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1: 49.
- Gállego, J., Portús, M. (1984). Etude préliminaire de la leishmaniose humaine et canine en Catalogne-Sud: A propos de l'étude enzymatique de quatre souches. *Colloque international sur la taxonomie et la phylogénèse des Leishmania*, CNRS, Montpellier (France).
- Gállego, M., Rioux, J.A., Rispail, P., Guilvard, E., Gállego, J., Portús, M., Delalbre, A., Bastien, P., Martínez Ortega, E., Fisa, R. (1990). Primera denuncia de flebotomos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) en la provincia de Lérida (España, Cataluña). *Revista Ibérica de Parasitología*, 50: 123-127.
- Gárate, T., Alvar, J. (1993). Técnicas del DNA aplicadas al diagnóstico de las enfermedades parasitarias. En: *Parasitología Molecular. Colección Nuevas Tendencias* vol, 24: 374-396.
- Gardener, P.J., Chance, M.L., Peters, W. (1974). Biochemical taxonomy of *Leishmania* II: Electrophoretic variation of malate dehydrogenase. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 68: 317-325.
- Gardiner, K., Laas, W., Patterson, D. (1986). Fractionation of larger mammalian DNA restriction fragments using vertical pulsed-field gradient gel electrophoresis. *Somatic Cell Molecular Genetic*, 12:185-195.
- Garin, J.P., Peyramond, D., Piens, M.A., Rioux, J.A., Godfrey, D.G., Lanotte, G., Pratlong, F. (1985). Présence de *leishmania major* Yakimoff et Schokhor, 1914 au Mali. Identification enzymatique d'une souche d'origine humaine. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 93-94.
- Garvey, E.P., Santi, D.V. (1986). Stable amplified DNA in drug-resistant *Leishmania* exists as extrachromosomal circles. *Science*, 233: 535-540.
- Gashumba, J.k., Baker, R.D., Godfrey, D.G. (1988). *Trypanosoma congolense*: the distribution of enzymic variants in East and West Africa. *Parasitology*, 96: 475-486.
- Ghalib, H.W., Eltoum, E.A., Kroon, C.C.M., El Hassan, A.M. (1992). Identification of *Leishmania* from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 158-160.
- Giannini, S.H. (1989). Chromosome size homologies in *Leishmania major* determined by molecular karyotyping. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (Hart, D.T. ed.), pp. 917-923, Plenum Press. New York.
- Giannini, S.H., Curry, S.S., Tesh, R.B., Van der Ploeg, L.H.T. (1990). Size-conserved chromosomes and stability of molecular karyotype in cloned stocks of *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 39: 9-22.
- Giannini, S.H., Schittini, M., Keithly, J.S., Warburton, P.W., Carton, Ch. R., Van der Ploeg, L.H.T. (1986). Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. *Science*, 232: 762-765.
- Gibson, W.C. (1985). Molecular karyotyping. *Parasitology Today*, 1: 64-65.
- Gibson, W.C. (1989). Analysis of a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Parasitology*, 99: 391-402.
- Gibson, W.C., Garside, L., Bailey, M. (1992). Trisomy and chromosome size changes in hybrid trypanosomes from a genetic cross between *Trypanosoma brucei rhodesiense* and *T. b. brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52: 189-200.

- Gibson, W.C., Gashumba, J.K. (1983). Isoenzyme characterization of some *Trypanozoon* stocks from a recent trypanosomiasis epidemic in Uganda. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 114-118.
- Githure, J.L., Hendricks, L.D., Schnur, L.F., Kilu, G., Perkins, P.V. (1986). Characterization of crithidia-like organism isolated from man, animals and sand flies in leishmaniasis endemic foci in Kenya. *Proceedings of the Seventh Annual Medical Scientific conference*. KEMRI/KETRI, Nairobi, Kenya: 243-247.
- Godfrey, D.G., Kilgour, V. (1976). Enzyme electrophoresis in characterizing the causative organism of Gambian trypanosomiasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 70: 219-229.
- Godfrey, D.G., Scott, C.M., Gibson, W.C., Mehlitz, D., Zillmann, U. (1987). Enzyme polymorphism and the identity of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology*, 94: 337-347.
- Goldberg, S.S., Pereira, A.A. (1983). Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology*, 69: 91-96.
- Gómez-Eichelmann, M.C., Holz, G. Jr., Beach, D., Simpson, A.M., Simpson, L. (1988). Comparison of several lizard *Leishmania* species and strains in terms of kinetoplast minicircle and maxicircle DNA sequences, nuclear chromosomes, and membrane lipids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27: 143-158.
- Gómez-Lus, P., Fields, B.S., Benson, R.F., Martin, W.T., O'Connor, S.P., Black, C.M. (1993). Comparison of arbitrarily primed polymerase chain reaction, ribotyping, and monoclonal antibody analysis for subtyping *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1940-1942.
- Goncalves de Lima, V.M.Q., Roitman, I., Kilgour, V. (1979). Five trypanosomatid species of insects distinguished by isoenzymes. *Journal of Protozoology*, 26: 648-652.
- González Castro, J., Morillas Márquez, F., Benavides Delgado, I. (1987). *Leishmania infantum* s. str., parasite du rat noir (*Rattus rattus*). a propos du typage enzymatique d'une souche isolée en Espagne, dans la province de Grenade. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 62: 101.
- Goodwin, P.H., Annis, S.L. (1991). Rapid identification of genetic variation and pathotype of *Leptosphaeria maculans* by random amplified polymorphic DNA assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2482-2486.
- Gradoni, L. (1993). Biochemical and molecular methods for *Leishmania* characterization. En: *Joint WHO/MZCP/HPI Workshop on the epidemiology, diagnosis and control of Leishmaniasis in the Mediterranean area*. Atenas, Grecia. pp. 45-47.
- Gradoni, L., Gramiccia, M. (1994). *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status?. *Parasitology Today*, 10: 264-267.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Betti, F. (1990). Fatal visceral disease caused by a dermatotropic *Leishmania* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infection*, 20: 169-184.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Maroli, M., Pozio, E. (1986). Infestations mixtes de *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 par différents zymodèmes du complexe *Leishmania infantum*. Etude expérimentale. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS INSERM, 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 305-310. IMEEE, Montpellier.
- Gradoni, L., Gramiccia, M., Léger, N., Pesson, B., Madulo-Leblond, G., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M., Walton, B.C. (1991). Isoenzyme characterization of *Leishmania* from man, dog and sandflies in the Maltese islands. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 217-219.

- Gradus, M.S., Matthews, H.M. (1985). Electrophoretic analysis of soluble proteins and esterase, superoxide dismutase and acid phosphatase isoenzymes of members of protozoan family trichomonadidae. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 81: 229-233.
- Gramiccia, M., Ben-Ismaïl, R., Gradoni, L., Ben Rachid, M.S., Ben Said, M. A. (1991). *Leishmania infantum* enzymatic variant, causative agent of cutaneous leishmaniasis in north Tunisia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 370-371.
- Gramiccia, M., Bettini, S., Yasarol, S. (1984). Isoenzyme characterization of *Leishmania* isolates from human cases of cutaneous leishmaniasis in Urfa, south-east, Turkey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 568.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., di Martino, L., Romano, R., ERcolini, D. (1992c). Two syntopic zymodemes of *Leishmania infantum* cause human and canine visceral leishmaniasis in the Naples area, Italy. *Acta Tropica*, 50: 357-359.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Pozio, E. (1986). Caractérisation biochimique de souches du complexe *Leishmania infantum* isolées en Italie. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 445-454. IMEEE, Montpellier.*
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Pozio, E. (1987). *Leishmania infantum sensu lato* as an agent of cutaneous leishmaniasis in Abruzzi region (Italy). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 235-237.
- Gramiccia, M., Gradoni, L., Troiani, M. (1992b). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 161-163.
- Gramiccia, M.; Maazoun, R., Lanotte, G., Rioux, J.A., Le Blancq, S., Evans, D.A., Peters, W., Bettini, S., Gradoni, L., Pozio, E. (1982). Typage enzymatique de onze souches de *Leishmania* isolées en Italie continentale, à partir de formes viscérales murines, canines et vulpines. Mise en évidence d'un variant enzymatique chez le Renard (*Vulpes vulpes*). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 57: 527-531
- Gramiccia, M., Smith, D.F., Angelici, M.C., Ready, P.D., Gradoni, L. (1992a). A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania infantum*. *Parasitology*, 105: 29-34.
- Grau, J.M., Bosch, X., Salgado, A.C., Urbano-Márquez, A. (1989). Human immunodeficiency virus (HIV) and aplastic anemia. *Annals of Internal Medicine*, 110:576-577.
- Graves, P.M., Carter, R., Keystone, J.S., Seeley, D.C. Jr. (1984). Drug sensitivity and isoenzyme type cloned lines of *Plasmodium falciparum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 212-219.
- Grimaldi, G. Jr., Kreutzer, R.D., Hashiguchi, Y., Gómez, E.A., Mimory, T., Tesh, R.B. (1992). Description of *Leishmania equatorensis* sp.N (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) a new parasite infecting arboreal mammals in Ecuador. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 221-228.
- Guerrini, F. (1992). Genetique des populations et phylogenie des *Leishmania* du nouveau monde. Thèse pour le Doctorat en Sciences Biologiques (Parasitologie). Université Montpellier II. 111 pp.
- Guevara, P., Alonso, G., da Silveira, J.P., de Mello, M., Scorza, J.V., Añez, N., Ramírez, J.L. (1992). Identification of a new world *Leishmania* using ribosomal gene spacer probes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 56: 15-26.
- Guilvard, E., Rioux, J.A., Gállego, M., Pratlong, F., Mahjour, J., Martínez-Ortega, E., Dereure, J.,

- Saddiki, A., Martini, A. (1991). *Leishmania tropica* au Maroc III. Rôle vecteur de *Phlebotomus sergenti*. a propos de 89 isolats. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 96-99.
- Guizani, I., Van Eys, G.J.J.M., Ben Ismail, R., Dellagi, K. (1994). Use of recombinant DNA probes for species identification of Old World *Leishmania* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 50: 632-640.
- Gutiérrez-Solar, B. (1992). Asymtomatic leishmaniasis. *M. Phil. degree*. University of Cambridge.
- Gutiérrez-Solar, B., Aguiar, A., Alvar, J. (1990). Electroforesis por gradiente de pulsos (RFE) en la caracterización de *Leishmania infantum*. En: *IV Congreso de la SEIMC, Madrid*:E 4/14.
- Hamers, R., Gajendran, N., Dujardin, J.C., Stuart, K. (1989). Circular and linear forms of small nucleic acids in *Leishmania*. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (Hart, D.T. ed.), pp. 985-988, Plenum Press. New York.
- Harris, H., Hopkinson, D.A. (1976). En: *Hand-book of Enzyme electrophoresis in Human Genetics*. North-Holland, Amsterdam.
- Hassan, M.Q., Das, S., Adhya, S. (1992). Mini-exon derived RNA gene of *Leishmania donovani*: structure, organization and expression. *Journal of Biosciences*, 17: 55-66.
- Hassan, M.Q., Ghosh, A., Ghosh, S.S., Gupta, M., Basu, D., Mallik, K.K., Adhya, S. (1993). Enzymatic amplification of mini-exon-derived RNA gene spacers of *Leishmania donovani*: primers and probes for DNA diagnosis. *Parasitology*, 107: 509-517.
- Hempelmann, E., Ling, I., Wilson, R.J.M. (1981). S-antigens and isozymes in strains of *Plasmodium falciparum*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 855-856.
- Hennessy, K.J., Iandolo, J.J., Fenwick, B.W. (1993). Serotype identification of *Actinobacillus pleuropneumoniae* by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1155-1159.
- Henriksson, J., Pettersson, U., Solari, A. (1993). *Trypanosoma cruzi*: Correlation between karyotype variability and isoenzyme classification. *Experimental Parasitology*, 77: 334-338.
- Hernández, R., Díaz de León, F., Castañeda, M. (1988). Molecular cloning and partial characterization of ribosomal RNA genes from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27: 275-280.
- Hernández, R., Rios, P., Valdés, A.M., Pinero, D. (1990). Primary structure of *Trypanosoma cruzi* small-subunit ribosomal RNA codon region: comparison with other trypanosomatids. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41: 207-212.
- Hightower, R.H., Bliska, J.B., Cozzarelli, N.R., Santi, D.V. (1989). Analysis of amplified DNAs from drug-resistant *Leishmania* by orthogonal-field-alternation gel electrophoresis. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 2979-2984.
- Hightower, R.C., Ruíz-Pérez, L.M., Wong, M.L., Santi, D.V. (1988). Extrachromosomal elements in the lower eukaryote *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, 263: 16970-16976.
- Hightower, R.C., Wong, M.L., Ruiz-Perez, L., Santi, D.V. (1987). Electron microscopy of amplified DNA forms in antifolate-resistant *Leishmania*. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 14618-14624.
- Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P. (1978). RNA from the insect trypanosome *Crithidia lucillae* contains transcripts of the maxicircle and not of the minicircle component of kinetoplast DNA. *Biochimica*

Biophysica Acta, 521: 407-411.

Hoeijmakers, J.H.J., Borst, P. (1982). Kinetoplast DNA in the insect trypanosomes *Crithidia luciliae* and *Crithidia fasciculata* II. Sequence evolution of the minicircles. *Plasmid*, 7: 210-220.

Homan, W.L., van Enkevort, F.H.J., Limper, L., Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Kasprzak, W., Majeswska, A.C., van Knapen, F. (1992). Comparison of *Giardia* isolates from different laboratoires by isoenzyme analysis and recombinant DNA probes. *Parasitology Research*, 78: 316-323.

Horak, P., Vrchotová, N., Meyer, E.A., Giboda, M. (1990). Isolation, cultivation and isoenzyme characterization of *Giardia intestinalis* strains. *Folia Parasitologica*, 37: 105-106.

Howard, M.K., Kelly, J.M., Lane, R.P., Miles, M.A. (1991). A sensitive repetitive DNA probe that is specific to the *Leishmania donovani* complex and its use as an epidemiological and diagnostic reagent. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 63-72.

Howard, M.K., Ogunkolade, W., Bryceson, A.D.M., Davidson, R.N., Moody, A.H., Miles, M.A. (1992). A DNA probe for human visceral leishmaniasis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 35-36.

Howard, M.K., Vexenat, A., Cuba Cuba, C., Fonseca de Castro, J.A., Bryceson, A., Moody, A., Davidson, R., Miles, M.A. (1990). Epidemiological and diagnostic evaluation of a *Leishmania donovani* complex nuclear DNA probe. *Second CEC meeting on leishmania: Field work, epidemiology, diagnosis and intervention*. pp. 39. Macuto, Venezuela.

Hunter, R.L., Market, C.L. (1957). Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science*, 125: 1294-1295.

Iovannisci, D.M., Beverley, S.M. (1989). Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34: 177-188.

Iovannisci, D.M., Goebel, D., Allen, K., Kaur, K., Ullman, B. (1984). Genetic analysis of adenine metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. Evidence for diploidy at the adenine phosphorybosyltransferase locus. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 14617-14623.

Isaac-Renton, J.L., Byrne, S.K., Prameya, R. (1988). Isoelectric focusing of ten strains of *Giardia duodenalis*. *Journal of Parasitology*, 74: 1054-1056.

Isaac-Renton, J.L., Cordeiro, C., Sarafis, K., Shahriari, H. (1993). characterization of *Giardia duodenalis* isolates from a waterborne outbreak. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 421-440.

Izri, M.A., Belazzoug, S. (1993). *Phlebotomus (Larrousius) perfiliiewi* naturally infected with dermatotropic *Leishmania infantum* at Tenes, Algeria. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 399.

Izri, M.A., Belazzoug, S., Boudjebba, Y., Dereure, J., Pratlong, S., Delalbre-Belmonte, A., Rioux, J.A. (1990). *Leishmania infantum* MON-1 isolé de *Phlebotomus perniciosus*, en Kabylie (Algérie). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 151-152.

Izri, M.A., Belazzoug, S., Pratlong, F., Rioux, J.A. (1992). Isolement de *Leishmania major* chez *Phlebotomus papatasi* à Briska (Algérie) fin d'une épopée écoépidémiologique. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67: 31-32.

Izri, M.A., Doumbo, O., Belazzoug, S., Pratlong, F. (1989). Présence de *Leishmania major* MON-26 au

Mali. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 510-511.

Jaccard, P. (1908) Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bulletin de la Société Vaudoise Sciences Naturelles*, 44: 223-270.

Jackson, P.R., Lawrie, J.M., Stiteler, J.M., Hawkins, D.W., Wohlhieter, J.A., Rowton, E.D. (1986). Detection and characterization of *Leishmania* species and strains from mammals and vectors by hybridization and restriction endonuclease digestion of kinetoplast DNA. *Veterinary Parasitology*, 20: 195-215.

Jackson, P.R., Wohlhieter, J.A., Jackson, J.E., Sayles, P., Diggs, C.L., Hockmeyer, W.T. (1984). Restriction endonuclease analysis of *Leishmania* kinetoplast DNA characterizes parasites responsible for visceral and cutaneous disease. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33: 808-819.

Jasmer, D.P., Stuart, K. (1986a). Conservation of kinetoplastid minicircle characteristics without nucleotide sequence conservation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18: 257-269.

Jasmer, D.P., Stuart, K. (1986b). Sequence organization in african trypanosome minicircles is defined by 18 base pair inverted repeats. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 18: 321-331.

Jayarao, B.M., Bassam, B.J., Caetano-Anolles, G., Gresshoff, P.M., Oliver, S.P. (1992). Subtyping of *Streptococcus uberis* by DNA amplification fingerprinting. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 1347-1350.

Jeannel, D., Tuppin, P., Brucker, G., Danis, M., Gentilini, M. (1989). Leishmaniasis in France. *Lancet*, : 804.

Jeffreys, A.J., Wilson, V., Thein, S.L. (1985). Hypervariable "minisatellites" regions in human DNA. *Nature*, 314: 6773.

Jenni, L. (1990). Sexual stages in trypanosomes and implications. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65 (Suppl.1): 19-21.

Jenni, L., Marti, S., Schweizer, J., Betschart, B., Le Page, R.W.F., Wells, J.M., Tait, A., Paindavoine, P., Pays, E., Steinert, M. (1986). Hybrid formation between African trypanosomes during cyclical transmission. *Nature*, 322: 173-175.

Jiménez, M.I., Ferrer, M., Cañavate, C., Gutiérrez-Solar, B., García, E., Benito, A., Alvar, J. (1993). Tipificación isoenzimática de cepas de *Leishmania infantum* aisladas de enfermos inmunocompetentes e inmunosuprimidos. *Acta Parasitológica Portuguesa*, 1: 154

Jiménez, M.I., Gutiérrez-Solar, B., Benito, A., Aguiar, A., García, E., Cercenado, E., Alvar, J. (1991). Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 95-99.

Jiménez, M.I., Laguna, F., Solís, F., Alvar, J. (1994). New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in HIV-positive co-infected patients from Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (en prensa).

Jiménez, M.I., Puente, S., Gutiérrez-Solar, B., Martínez, P., Alvar, J. (1994). Visceral leishmaniasis in Angola due to *Leishmania (Leishmania) infantum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 687-692.

Joliffe, D.S., Evans, D.A., Bryceson, A.D.M. (1986). Cutaneous leishmaniasis. *British Journal of Dermatology*, 114: 745-749.

Joshi, H., Subbaran, S.K., Raghavendra, K., Sharma, V.P. (1989). *Plasmodium vivax*: enzyme

- polymorphism in isolates of Indian origin. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 179-181.
- Kambhampati, S., Black IV, W.C., Rai, K.S. (1992). Random amplified polymorphic DNA of mosquito species and populations (Diptera: Culicidae): Techniques, Statistical analysis, and applications. *Journal of Medical Entomology*, 29: 939-945.
- Kapler, G.M., Zhang, K., Beverley, S.M. (1990). Nuclease mapping and DNA sequence analysis of transcripts from the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase (R) region of *Leishmania major*. *Nucleic Acids Research*, 18: 6399-6408.
- Katakura, K., Peng, Y., Pithawalla, R., Detke, S., Chang, K-P. (1991). Tunicamycin-resistant variants from five species of *Leishmania* contain amplified DNA in extrachromosomal circles of different sizes with a transcriptionally active homologous region. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 233-244.
- Kelly, J.M., Law, J.M., Chapman, C.J., Van Eys, G.J.J.M., Evans, D.A. (1991). Evidence of genetic recombination in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46: 253-264.
- Kennedy, W.P.K. (1984). Novel identification of differences in the kinetoplast DNA of *Leishmania* isolates by recombinant DNA techniques and in situ hybridisation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 12: 313-325.
- Kidane, G.Z., Hughes, D., Simpson, L. (1984). Sequence heterogeneity and anomalous electrophoretic mobility of kinetoplast minicircle DNA from *Leishmania tarentolae*. *Gene*, 27: 265-277.
- Killick-Kendrick, R. (1990). The life-cycle of *Leishmania* in the sandfly with special reference to the form infective to the vertebrate host. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 37-42.
- Killick-Kendrick, R. (1991a). *Leishmania*: cycle intravectoriel. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 71-74.
- Killick-Kendrick, R. (1991b). Leishmaniasis and "Desert Storm". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 698.
- Killick-Kendrick, R., Bryceson, A.D.M., Peters, W., Evans, D.A., Leaney, A., Rioux, J.A. (1985). Zoonotic cutaneous leishmaniasis in Saudi Arabia: lesions healing naturally in man followed by a second infection with the same zymodeme of *Leishmania major*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 363-365.
- Killick-Kendrick, R., Molyneux, D.H., Rioux, J.A., Lanotte, G., Leaney, A.I. (1980). Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*, 74: 563-565.
- Kilvington, S., Mann, P., Warhurst, D. (1983). Differentiation between *Naegleria fowleri* and *N. lovaniensis* using isoenzyme electrophoresis of aspartate aminotransferase. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 562-563.
- Kitchen, P.A., Klein, V.A., Fein, B.I., Englund, P.T. (1984). Gapped mini-circles: A novel replication intermediate of kinetoplast DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 259: 15532-15539.
- Kleisen, C.M., Borst, P., Weijers, P.J. (1976). The structure of kinetoplast DNA. 1. The Mini-circles of *Crithidia luciliae* are heterogeneous in base sequence. *European Journal Biochemistry*, 64: 141-151.
- Knowles, G., Betschart, B., Kukla, B.A., Scott, J.R., Majiwa, P.A.O. (1988). Genetically discrete populations of *Trypanosoma congolense* from livestock on the Kenyan coast. *Parasitology*, 96: 461-474.

- Kreutzer, R.D., Corredor, A., Grimaldi, G. Jr., Grogg, M., Rowton, E.G., Young, D.G., Morales, A., McMahon-Pratt, D., Guzman, H., Tesh, R.B. (1991). Characterization of *Leishmania colombiensis* sp. n. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a new parasite infecting humans, animals, and phlebotomine sand flies in Panamá. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 44: 662-675.
- Kreutzer, R.D., Christensen, H.A. (1980). Characterization of *Leishmania* spp. by isoenzyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 199-208.
- Kreutzer, R.D., Semko, M.E., Hendricks, L.D., Wright, N. (1983). Identification of *Leishmania* spp. by multiple isozyme analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32: 703-715.
- Kreutzer, R.D., Souraty, N., Semko, M.E. (1987). Biochemical identities and differences among *Leishmania* species and subspecies. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36: 22-32.
- Kreutzer, R.D., Sousa, O. E. (1980). Biochemical characterization of *Trypanosoma* spp. by isozyme electrophoresis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 30: 308-317.
- Laham, S.M., Gredom, J.M., Miles, M.A., Póvoa, M.M., de Souza, A.A.A. (1981). A comparison of electrophoretic methods for isoenzyme characterization of trypanosomatids. I: Standard stocks of *Trypanosoma cruzi* zymodemes from northeast Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 742-750.
- Lainson, R. (1984). Cutaneous leishmaniasis in Belize, Central America, and identity of the causative parasite. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 851.
- Lainson, R., Braga, R.R., de Souza, A.A.A., Póvoa, M.M., Ishikawa, E.A.Y., Silveira, F.T. (1989). *Leishmania* (*Viannia*) *shawii* n. sp., a parasite of monkeys, sloth and procyonids in Amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 282-284.
- Lainson, R., Shaw, J.J. (1972). Leishmaniasis in the New World: Taxonomic problems. *British Medical Bulletin*, 28: 44-48.
- Lainson, R., Shaw, J.J. (1979). The role of animals in the epidemiology of south american leishmaniasis. En: *Biology of the kinetoplastida*. (W.H.R. Lumsden and D.A. Evans, Eds.), Vol.2. pp. 1-116. Academic Press Inc: London, New York.
- Lainson, R., Shaw, J.J. (1986). The genus *Leishmania* Ross, 1903. Speculations on evolution and speciation. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques*. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 241-245. IMEEE, Montpellier, France.
- Lainson, R., Shaw, J.J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, Vol. 1 (W. Peters and Killick-Kendrick, eds), pp. 1-120, Academic Press, London.
- Lainson, R., Shaw, J.J. (1989). *Leishmania* (*Viannia*) *naiffi* sp. n., a parasite of the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (L.) in amazonian Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 3-9.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Miles, M.M., Póvoa, M. (1982). Leishmaniasis in Brazil: XVII. enzymic characterization of a *Leishmania* from the armadillo, *Dasypus novemcinctus* (Edentata), from Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 810-811.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ready, P.D., Miles, M.A., Póvoa, M. (1981). Leishmaniasis in Brazil: XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sandflies, wild mammals and man in north Pará State, with particular reference to *Leishmania braziliensis guyanensis* causative agent of "pian-bois". *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 530-536.

- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Fraiha, H. (1983). Leishmaniasis in Brazil. XIX: Visceral leishmaniasis in the Amazon Region, and the presence of *Lutzomyia longipalpis* on the Island of Marajó, Pará State. *Transactions of the Royal Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 323-330.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Braga, R.R. (1987). American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 517.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Silveira, F.T., Braga, R.R., Ishikawa, E.A.Y. (1990). Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) naiffi* Lainson and Shaw, 1989. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 282-284.
- Lainson, R., Shaw, J.J., Ward, R.D., Ready, P.D., Naiff, R.D. (1979). Leishmaniasis in Brazil: XIII. Isolation of *Leishmania* from armadillos (*Dasypus novemcinctus*), and observations on the epidemiology of cutaneous leishmaniasis in north Pará State. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 239-242.
- Laird, P.W. (1989). Trans splicing in trypanosomas-archaism or adaptation. *Trends Genetics*, 5: 204-208.
- Lamaury, J., Reynes, J., Pratlong, F., Dereure, J., Dedet, J.P., Janbon, F. (1993). Visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: Epidemiological and bio-clinical features. En: *Abstract Book (Volume I) of IX International Conference on AIDS*. Berlin. p. 378.
- Lanotte, G., Rioux, J.A. (1990). Mise en évidence d'un processus de cytogamie chez les *Leishmania* (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 47-48.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Maazoun, R., Pasteur, N., Pratlong, F., Lepart, J. (1981). Application de la méthode numérique à la taxonomie du genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien Monde. Utilisation des allozymes. Corollaires épidémiologiques et phylétiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 56: 575-592.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Pratlong, F. (1980). Ecologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 14. Les leishmanioses humaines en Cévennes. *Annales de Parasitologie (Paris)*, 55: 635-643.
- Lanotte, G., Rioux, J.A., Serres, E. (1986). Approche cladistique du genre *Leishmania* Ross, 1903. A propos de 192 souches originaires de l'Ancien Monde. Analyse numérique de 50 zymodèmes identifiés par 15 enzymes et 96 isoenzymes. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984)* (Rioux J.A., ed.). pp. 269-288. IMEEE, Montpellier.
- Lares-Villa, F., De Jonckheere, J.F., De Moura, H., Rechi, A., Ferreira, E., Fernandes, S., Ruiz, C., Visvesvara, R.S. (1993). five cases of primary amebic meningoencephalitis in Mexicali, Mexico: study of the isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 685-688.
- Laskay, T., Kiessling, R., De Wit, T.F.R., Wirth, D.F. (1991a). Generation of species-specific DNA probes for *Leishmania aethiopica*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 44: 279-286.
- Laskay, T., Gemetchu, T., Teferedegn, H., Frommel, D. (1991b). The use of DNA hybridization for the detection of *Leishmania aethiopica* in naturally infected sandfly vectors. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 599-602.
- Lawrie, J.M., Jackson, P.R., Stiteler, J.M., Hockmeyer, W.T. (1985). Identification of pathogenic *Leishmania* promastigotes by DNA: DNA hybridization with kinetoplast DNA cloned with *Escherichia coli* plasmids. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 257-265.

- Le Blancq, S.M. (1986). Enzyme characterization and epidemiology of Old World *Leishmania*. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 333-339. IMEEE, Montpellier.
- Le Blancq, S.M., Peters, W. (1986a). *Leishmania* in the Old World: 1. The geographical and hostal distribution of *L. major* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80 : 99-112.
- Le Blancq, S.M., Peters, W. (1986b). *Leishmania* in the Old World: 4. The distribution of *L. donovani* sensu lato zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 367-377.
- Le Blancq, S.M., Belehu, A., Peters, W. (1986b). *Leishmania* in the Old World: 3. The distribution of *L. aethiopica* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 360-366.
- Le Blancq, S.M., Desser, S.S., Shkap, V., Pipano, E. (1986c). Besnoitia strain differentiation using isoenzyme electrophoresis. *Journal of Parasitology*, 72: 475-476.
- Le Blancq, S.M., Lanham, S.M., Evans, D.A. (1987). Appendix IV. Comparative isoenzyme profiles of Old and New World *Leishmania*. En: *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*. Volume I. biology and Epidemiology. (Peters, W.; Killick-Kendrick, R. Eds.). Academic Press Inc. (London). pp. 543-541.
- Le Blancq, S.M., Schnur, L.F., Peters, W. (1986a). *Leishmania* in the Old World: 2. Heterogeneity among *Leishmania tropica* zymodemes. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 103-119.
- Le Blancq, S.M., Schnur, L.F., Schlein, Y. (1983). An apparent association of enzyme variants of *Leishmania major* with specific geographical areas in Israel. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 76: 543-548.
- Léger, N., Gramiccia, M., Gradoni, L., Madulo-Leblond, G., Pesson, B., Ferté, H., boulanger, N., Killick-Kendrick, R., Killick-Kendrick, M. (1988). Isolation and typing of *Leishmania infantum* from *Phlebotomus neglectus* on the island of Corfu, Greece. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 419-420.
- Lehmann, P.F., Lin, D., Lasker, B.A. (1992). Genotypic identification and characterization of species and strains within the genus *Candida* by using random amplified polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 30: 3249-3254.
- León, W., Fouts, D.L., Manning, J. (1978). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. *Nucleic Acids Research*, 5: 491-504.
- Le Page, R.F. W., Wells, J.M., Prospero, T.D., Stenberg, J. (1988). Genetic analysis of a hybrid *Trypanosoma brucei*. En: *Current Communications in Molecular Biology: Molecular Genetics of Parasitic Protozoa* (ed. Turner, M.J. y Arnot, D.) pp. 65-71. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Levine, N., Corliss, J., Cox, F., Deroux, G., Grain, J., Honigberg, B., Leedale, G., Loeblich, A., Lom, J., Lynn, D., Merinfeld, E., Page, F., Poljansky, G., Sprague, V., Vra, J., Wallace, F. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *Journal of Protozoology*, 27: 37-58.
- Licois, D., Cere, N., Humbert, J.F., Rapy, A. (1994). Utilisation de la RAPD-PCR pour la différenciation inter et intra-spécifique des *Eimeria* du Lapin: premiers résultats. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Lighthall, G.K., Giannini, S.H. (1992). The chromosomes of *Leishmania*. *Parasitology Today*, 8: 192-199.

- Liu, J., Gajendran, N., Muthui, D., Dujardin, J.C., Le Ray, D., Hamers, R. (1990). Genetic mapping of a circular extrachromosomal element in *Leishmania mexicana* M379 ITMAP 2167 and its related region in a linear chromosome of *Leishmania mexicana* M379 ITMAP 2048. *Second CEC meeting on leishmania: Field work, epidemiology, diagnosis and intervention*. pp. 71. Macuto, Venezuela.
- Liu, J., Gajendran, N., Muthui, D., Muyldermans, S., Dujardin, J.C., De Doncker, S., Jacquet, D., Le Ray, D., Mathieu-Daudé, F., Hamers, R. (1991). Chromosome rearrangement in *Leishmania mexicana* M379. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 46: 53-60.
- Liu, J., Muthui, D., Gajendran, N., Hamers, R. (1989). Analysis of CD1 and LD1-like elements in *Leishmania mexicana*. En: EUROLEISH/ECC Congress, Oostende. pp. 40.
- Liu, J., Salinas, G., Gajendran, N., Muthui, D., Muyldermans, S., Hamers, R. (1992). DNA recombination associated with short direct repeats in *Leishmania mexicana* M379. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 50: 351-354.
- Long, P.L., Joyner, L.P. (1984). Problems in the identification of species of *Eimeria*. *Journal of Protozoology*, 31: 535-541.
- Looker, D., Miller, L.A., Elwood, H.J., Stickel, S., Sogin, M.L. (1988). Primary structure of *Leishmania donovani* small subunit ribosomal RNA coding region. *Nucleic Acids Research*, 16: 7198.
- Lopes, V.G., Momen, H., Grimaldi, G., Marzochi, C.A., Pacheco, R.S., Morel, C.M. (1984). Schizodeme and zymodeme characterization of *Leishmania* in the investigation of foci of visceral and cutaneous Leishmaniasis. *Journal of Parasitology*, 70: 89-98.
- Lopes, U.G., Wirth, D. F. (1986). Identification of visceral *Leishmania* species with cloned sequences of kinetoplast DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 20: 77-84.
- López, M., Montoya, Y., Arana, M., Cruzalegui, F., Braga, J., Llanos-Cuentas, A., Romero, G., Arévalo, J. (1988). The use of nonradioactive DNA probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 38: 308-314.
- López, M., Montoya, Y., Llanos-Cuentas, A., Arevalo, J. (1989). Biotinylated kDNA from *Leishmania braziliensis*. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (Hart, D.T. ed.), pp. 525-529, Plenum Press. New York.
- Lortholary, O., Mechali, D., Christiaens, D., Gougerot Pocidalo, M., Brandely, M., Babinet, P. (1990). Interferon-associated with conventional therapy for recurrent visceral leishmaniasis in a patient with AIDS. *Reviews of Infectious Diseases*, 12: 370-371.
- Loudon, K.W., Burnie, J.P., Coke, A.P., Matthews, R.C. (1993). Application of polymerase chain reaction to fingerprinting *Aspergillus fumigatus* by random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 1117-1121.
- Lumsden, (1977). Problems in characterization and nomenclature of trypanosome populations. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 57: 361-368.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Pasteur, N., Rioux, J.A., Kennou, M.F., Pratlong, F. (1981b). Écologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cévennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. *Annales de Parasitologie (Paris)* 56: 131-146.
- Maazoun, R., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pasteur, N., Killick-Kendrick, R., Pratlong, F. (1981a). Signification du polymorphisme enzymatique chez les leishmanies. A propos de trois souches hétérozygotes

- de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, *Leishmania cf. tarentolae* Wenyon, 1921 et *Leishmania aethiopica* Bray, Ashford et Bray, 1973. *Annales de Parasitologie (Paris)*, 56: 467-475.
- Maazoun, R., Pratlong, F., Lanotte, G., Rioux, J.A. (1986). Le coomplexe *Leishmania major*. a propos de de l'analyse numérique de 35 souches identifiées par le méthode enzymatique. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984)* (Rioux J.A., ed.). pp. 119-125. IMEEE, Montpellier.
- Macedo, A.M., Melo, M.N., Gomes, R.F., Pena, S.D.J. (1992). DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 53: 63-70.
- MacGowan, A.P., O'Donaghue, K., Nicholls, S., McLauchlin, J., Bennett, P.M., Reeves, D.S. (1993). Typing of *Listeria* spp. by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Journal of Medical Microbiology*, 38: 322-327.
- Macina, R.A., Sánchez, D.O., Gluschkof, D.A., Burrone, O.R. Frasch, A.C.C. (1986). Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 21: 25-32.
- MacPherson, J.M., Gajadhar, A.A. (1992). Random amplified polymorphic DNA. *Parasitology Today*, 8: 235.
- Maggill, A.J., Grogl, M., Gasser, R.A., Sun, W., Oster, C.N. (1993). Visceral infection caused by *Leishmania tropica* in veterans of Operation Desert Storm. *New England Journal Medicine*, 328: 1383-1387.
- Majiwa, P.A.O., Maina, M., Waitumbi, J.N., Mihok, S., Zweygarth, E. (1993). *Trypanosoma (Nannomonas) congolense*: molecular characterization of a new genotype from Tsavo, Kenya. *Parasitology*, 106: 151-162.
- Mallinson, D.J., Coombs, G.H. (1989). Interaction of *Leishmania* metacyclics with macrophages. *International Journal for Parasitology*, 19: 647-656.
- Mansour, N.S., Fryauff, D.J., Modi, G.B., Mikhail, E.M., Youssaf, F.G. (1991). Isolation and characterization of *Leishmania major* from *Phlebotomus papatasi* and military personnel in north Sinai, Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 590-591.
- Marker, C.L., Moller, F. (1959). Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic, and species-specific patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 45: 753-763.
- Maroli, M., Gramiccia, M., Gradoni, L. (1987). Natural infection of *Phlebotomus perfiliewi* with *Leishmania infantum* in a cutaneous leishmaniasis focus of the Abruzzi region, Italy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 596-598.
- Martín, J., Morillas, F., Sanchiz, M.C., Acedo, C. (1992). Infección natural de *Phlebotomus perniciosus* por dos zimbodemos distintos del complejo *Leishmania infantum* en el Sudeste de España. *Actas do V Congreso Ibérico de Entomología. Boletín de la Sociedad Potuguesa de Entomología I (suppl 3)*: 513-520.
- Martín, J., Morillas, F., Sanchiz, M.C., Acedo, C. (1994). Isoenzymatic characterization of the etiologic agent of canine leishmaniasis in the Granada region of southern Spain. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 758-762.
- Martínez, P., de la Vega, E., Laguna, F., Soriano, V., Puente, S., Moreno, V., Sentchordi, M.J., García-Aguado, C., González-Lahoz, J. (1993). Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *Aids*, 7: 227-230.

- Marty, P., Fuzibet, J.G., Pratlong, F., Quinsat, D., Gari-Toussaint, M., Dor, J.F., Le Fichoux, Y., Rioux, J.A. (1991). Leishmaniose viscérale causée par une souche dermatrope de *Leishmania infantum* chez un sidéen. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 84: 365-367.
- Marty, P., Le Fichoux, Y., Pratlong, F., Gari-Toussaint, M. (1994). Human visceral leishmaniasis in Alpes-Maritimes, France: epidemiological characteristics for the period 1985-1992. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 33-34.
- Marty, P., Pesce, A., Fuzibet, J.G., Bernard, E., Bertrand, F., Saint-Paul, M.C., Gari-Toussaint, M., Le Fichoux, Y. (1989). Aspects biocliniques de la leishmaniose viscérale chez les sideens. A propos de 7 observations au C.H.U. de Nice. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7: 160-161.
- Massamba, N.H. (1990). Genetic diversity in *Leishmania major*. En: Résumés VII Congrès International de Parasitologie. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* (Suppl. I). (Doby, J.M. Ed.) S3.B30: 247
- Mathieu-Daudé, F., Tibayrenc, M. (1994). Isozyme variability of *Trypanosoma brucei* s.l.: Genetic, taxonomic, and epidemiological significance. *Experimental Parasitology*, 78: 1-19.
- Matías, R., Schottelius, J., Raddatz, Ch.F., Michel, R. (1991). Species identification and characterization of an *Acanthamoeba* strain from human cornea. *Parasitology Research*, 77: 469-464.
- Mayrhofer, G., Andrews, R.H., Ey, P.L., Albert, M.J., Grimmond, T.R., Merry, D.J. (1992). The use of suckling mice to isolate and grow *Giardia* from mammalian faecal specimens for genetic analysis. *Parasitology*, 105: 255-263.
- Mazurier, S.I., Audurier, A., Marquet-Van der Mee, N., Notermans, S., Wernars, K. (1992). A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. *Research in Microbiology*, 143: 507-512.
- Mazurier, S.I., Wernars, K. (1992). Typing of *Listeria* strains by random amplification of polymorphic DNA. *Research in Microbiology*, 143: 499-505.
- McDaniel, J.P., Dvorak, J.A. (1993). Identification, isolation and characterization of naturally occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57: 219-222.
- McGhee, R.B., Cosgrove, W.B. (1980). Biology and Physiology of the lower trypanosomatidae. *Microbiological Reviews*, 44: 140-173.
- Mebrathu, Y.B., Lawyer, P.G., Pamba, H., Koech, D., Perkins, P.V., Roberts, C.R., were, J.B., Hendricks, L.D. (1992). Biochemical characterization and zymodeme classification of *Leishmania* isolates from patients, vectors, and reservoir hosts in Kenya. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 47: 852-892.
- Medrano, F.J., Alemán Lorenzo, A., Beato Pérez, J.L. (1986). Leishmaniosis visceral de curso fatal asociada a infección por HTLV-III. *Medicina Clínica*, 87: 780.
- Medrano, F.J., Hernández-Quero, J., Jiménez, E., Pineda, J.A., Rivero, A., Sánchez-Quijano, A., Vélez, I.D., Viciano, P., Castillo, R., Reyes, M.J., Carvajal, F., Leal, M., Lissen, E. (1992). Visceral leishmaniasis in HIV-1-infected individuals: a common opportunistic infection in Spain?. *Aids*, 6: 1499-1503.
- Meloni, B.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A. (1988). Isoenzyme electrophoresis of 30 isolates of *Giardia* from humans and felines.
- Meloni, B.P., Lymbery, A.J., Thompson, R.C.A. (1989). Characterization of *Giardia* isolates using a non-radiolabeled DNA probe, and correlation with the results of isoenzyme analysis. *American Journal of*

Tropical Medicine and Hygiene, 40: 629-637.

Meloni, B.P., Thompson, R.C.A. (1987). Comparative studies on the axenic *in vitro* cultivation of *Giardia* of human and canine origin: evidence for intraspecific variation. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 637-640.

Meunier, J.R., Grimont, P.A.D. (1993). Factors affecting reproducibility of random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Research in Microbiology*, 144: 373-379.

Meyruey, M., Benkiran, D., Landon, A. (1974). Leishmaniose stomatopharyngo-laryngée observée au Maroc. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 67: 625-632.

Miles, M.A. (1983). The epidemiology of South American Trypanosomiasis-biochemical and immunological approaches and their relevance to control. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 5-23.

Miles, M.A., Apt B, W., Widmer, G., Póvoa, M.M., Schofield, C.J. (1984). Isoenzyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 526-535.

Miles, M.A., Cibulskis, R.E. (1986). Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 2: 94-87.

Miller, S.I., Landfear, S., Wirth, D.F. (1986). Cloning and characterization of a *Leishmania* gene encoding a RNA spliced leader sequence. *Nucleic Acids Research*, 14: 7341-7360.

Miles, M.A., Lanham, S.M., de Souza, A.A.A., Póvoa, M. (1980). Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 221-237.

Miles, M.A., Póvoa, M.M., de Souza, A.A., Lainson, R., Shaw, J.J. (1979). Some methods for the enzymic characterization of latin-American *Leishmania* with particular reference to *Leishmania mexicana amazonensis* and subspecies of *Leishmania hertigi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 243-252.

Mimori, T., Grimaldi Jr., G., Kreutzer, R.D., Gómez, E.A., McMahon-Pratt, D., Tesh, R.B., Hashiguchi, Y. (1989). Identification, using isoenzyme electrophoresis and monoclonal antibodies of *Leishmania* isolated from humans and wild animals of Ecuador. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 40: 154-158.

Mirelman, D., Bracha, R. (1984). *Entamoeba histolytica*: virulence enhancement of isoenzyme-stable parasites. *Experimental Parasitology*, 57: 172-177.

Mirelman, D., Bracha, R., Chayen, A. (1986a). *Entamoeba histolytica*: Effect of growth conditions and bacterial associates on isoenzyme patterns and virulence. *Experimental Parasitology*, 62: 142-148.

Mirelman, D., Bracha, R., Wexler, A., Chayen, A. (1986b). Changes in isoenzyme patterns of a cloned culture of nonpathogenic *Entamoeba histolytica* during axenization. *Infection and Immunity*, 54: 827-832.

Mirelman, D. (1987). Effect of culture conditions and bacterial associates on the zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today*, 3: 37-40.

Missoni, E., Morelli, R., Balladares, L., Berrios, J., de Solan, M.D., Baldwin, C.I., Evans, D.A. (1986). Isolation and characterization of leishmanias from Nicaragua. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 999-1000.

Molina, R., Amela, C., Nieto, J., San-Andrés, M., González, F., Castillo, J.A., Lucientes, J., Alvar, J. (1994b). Infectivity of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* to colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 491-493.

Molina, R., Cañavate, C., Cercenado, E., Laguna, F., López-Vélez, R., Alvar, J. (1994a). Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in ten patients with HIV-infection using colonized *Phlebotomus perniciosus*. *Aids*, 8: 277-279.

Molina, R., López-Vélez, R., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M.I., Alvar, J. (1992). Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 516.

Molyneux, D.H. (1974). Virus-like particles in *Leishmania* parasites. *Nature*, 249: 588-589.

Molyneux, D.H., Killick-kendrick, R. (1987). Morphology, ultrastructure and life cycles. En: The leishmaniasis in Biology and Medicine, (Peters, W., Killick-Kendrick, R., ed.), Vol. 1. *Academic Press*, London, p.121-176.

Molyneux, D.H., Ryan, L., Lainson, R., Shaw, J.J. (1986). The *Leishmania*-sandfly interface. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 311-324. *IMEEE*, Montpellier.

Momen, H. (1984). Parasite characterization by zymodeme analysis. En: *Genes and antigens of parasites. A laboratory manual*. 2nd ed. pp. 111-1

Momen, H., Grimaldi Jr., G., Pacheco, R.S., Jaffe, C.L., McMahon-Pratt, d., Marzochi, M.C.A. (1985). Brazilian *Leishmania* stocks phenotypically similar to *Leishmania major*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 1076-1084.

Montalban, C., Calleja, J.L. (1990b). Leishmaniasis visceral: una nueva infección oportunista en portadores de virus de la inmunodeficiencia humana. *Medicina Clínica, (Barcelona)*, 94: 176-179.

Montalban, C., Calleja, J.L., Erice, A., Laguna, F., Clotet, B., Podzamczar, D., Cobo, J., Mallolas, J., Yebra, M., Gallego, A., and the Co-operative group for the study of leishmaniasis in AIDS. (1990a). Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infection*, 21: 261-270.

Montalban, C., Martínez-Fernández, Calleja, J.L., García-Díaz, J. de D., Rubio, R., Dronda, F., moreno, S., Yebra, M., Barros, C., Cobo, J., Martínez, M.C., Rufz, F., Costa, J.R. (1989). Visceral leishmaniasis (Kala-azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Reviews of Infectious Diseases*, 11: 655-660.

Montamat, E.E., Arauzo, S. (1987). Characterization by electrophoretic zymograms of 19 *Trypanosoma cruzi* clones derived from two chronic chagasic patients. *Comp. Biochem. Physiol.*, 87: 417-422.

Montamat, E.E., de Luca d'Oro, G., Perret, B., Rivas, C. (1992). Characterization of *Trypanosoma cruzi* from Argentina by electrophoresis zymograms. *Acta Tropica*, 50: 125-133.

Morel, C., Simpson, L. (1980). Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 1070-1074.

Morel, C., Chiari, E., Plessmann Camargo, E., Mattei, D.M., Romanha, A.J., simpson, L. (1980). Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by patter of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 77: 6810-6814.

Morel, C.M., Deane, M.P., Gonçalves, A.M. (1986). The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitology Today*, 2: 97-101.

Moreno, G., Pratlong, F., Vélez, I.D., Restrepo, M., Rioux, J.A. (1986a). Individualization du complexe *Leishmania guyanensis*. A propos de l'analyse numérique de sept zymodèmes. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 165-172. IMEEE, Montpellier.

Moreno, G., Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F., Serres, E. (1986b). Le complexe *Leishmania donovani* s.l. analyse enzymatique et traitement numérique. Individualization du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984) (Rioux J.A., ed.). pp. 105-117. IMEEE, Montpellier.

Morgan, U.M., Constantine, C.C., Greene, W.K., Thompson, R.C.A. (1993). RAPD (random amplified polymorphic DNA) analysis of *Giardia* DNA and correlation with isoenzyme data. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 702-705.

Morillas, F., Benavides, I., González, J., Magana, A., Valero, A. (1985). Découverte de *Leishmania* sp. dans des *Rattus rattus* de la province de Grenade (Espagne). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 60: 768-770.

Moss, D.M., Brandt, F.H., Mathews, H.M., Visvesvara, G.S. (1988). High-resolution polyacrylamide gradient gel electrophoresis (PGGE) of isoenzymes from five *Naegleria* species. *Journal of Protozoology*, 35: 26-31.

Moss, D.M., Healy, G.R., Dickerson, J.W., Mathews, H.M. (1986). Isoenzyme analysis of *Babesia microti* infections in humans. *Journal of Protozoology*, 33: 213-215.

Moss, D.M., Mathews, H.M. (1987). A fast electrophoretic isoenzyme technique for the identification of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* and "*Entamoeba histolytica*-like" organisms. *Journal of Protozoology*, 34: 253-255.

Mukherjee, R.M., Bhol, K.C., Mehra, S., Maitra, T.K., Jalan, K.N. (1993). Zymodeme alteration of *Entamoeba histolytica* isolates under varying conditions. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 490-491.

Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155: 335-350.

Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol*, 51: 263-273.

Murphy, R.W., Sites, J.W.Jr., Buth, D.G., Haufler, C.H. (1990). Proteins I: Isozyme electrophoresis. En: *Molecular systematics*. (Hillis, D.M. y Moritz, C. eds.). pp. 45-126.

Murthy, V.K., Dibbern, K.M., Campbell, D.A. (1992). PCR amplification of mini-exon genes differentiates *Trypanosoma cruzi* from *Trypanosoma rangeli*. *Molecular and Cellular Probes*, 6: 237-243.

Myers, L.E., Silva, S.V.P.S., Procunier, J.D., Little, P.B. (1993). Genomic fingerprinting of *Haemophilus somnus* isolates by using a random-amplified polymorphic DNA assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 512-517.

Myint-Oo, Myint-Lwin, Min-Zaw, Ye-Htut. (1984). Isoenzyme characterization of chloroquine-resistant

- isolates of *Plasmodium falciparum* from Burma. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 471-473.
- Nakamura, T., Konishi, T., Kawaguchi, H., Hayashi, Y. (1988). glucose phosphate isomerase isozymes as genetic markers for lines of *Eimeria tenella*. *Parasitology*, 96: 281-288.
- Navarro, M., Maingon, R., Hamers, R., Segovia, M. (1992). Dynamics and size polymorphisms of minichromosomes in *Leishmania major* LV-561 cloned lines. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 55: 65-74.
- Nerad, T.A., Daggett, P.M. (1979). Starch gel electrophoresis: an effective method for separation of pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* strains. *Journal of Parasitology*, 26: 613-615.
- Nozaki, T., da Silva Aca, I., Okuzawa, E., Magalhaes, M., Tateno, S., Takeuchi, T. (1990). Zymodemes of *Entamoeba histolytica* isolated in the Amazon and the north-east of Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 387-388.
- Nozaki, T., Motta, S.R.N., Takeuchi, T., Kobayashi, S., Sargeant, P.G. (1989). Pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* in Japanese male homosexual population. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 525.
- Ntambi, J.M., Englund, P.T. (1985). A gap at a unique location in newly replicated kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma equiperdum*. *Journal of Biological Chemistry*, 260: 5574-5579.
- O'Donoghue, P.J., Adams, M., Dixon, B.R., Ford, G.E., Baverstock, P.R. (1986). Morphological and biochemical correlates in the characterization of *Sarcocystis* spp. *Journal of Protozoology*, 33: 114-121.
- Ouellette, M., Fasa-Fowler, F., Borst, P. (1990). The amplified H circle of methotrexate-resistant *Leishmania tarentolae* contains a novel P-glycoprotein gene. *Embo Journal*, 9: 1027-1033.
- Pacheco, R.S., Lopes, U.G., Morel, C.M., Grimaldi, G. Jr., Momen, H. (1986). Schizodeme analysis of *Leishmania* isolates and comparison with some phenotypic techniques. En: *Leishmania. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984)* (Rioux J.A., ed.). pp. 57-75. IMEEE, Montpellier.
- Pagès, M., Bastien, P., Veas, F., Rossi, V., Bellis, M., Wincker, P., Rioux, J.A., Roizès, G. (1989). Chromosome size and number polymorphisms in *Leishmania infantum* suggest amplification/deletion and possible genetic exchange. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 36: 161-168.
- Pagès, M., Bastien, P., Blaineau, C. (1992). Reply. *Parasitology Today*, 8: 306.
- Paindavoine, P., Zampetti-Bosseler, F., Pays, E., Schweizer, J., Guyaux, M., Jenni, L., Steinert, M. (1986). Trypanosome hybrids generated in tse-tse flies by nuclear fusion. *The Embo Journal*, 13: 3631-3636.
- Paindavoine, P., Zampetti-Bosseler, F., Coquelet, M., Pays, E., Steinert, M. (1989). Different allele frequencies in *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei gambiense* populations. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32: 61-72.
- Palittapongarnpim, P., Chomyc, S., Fanning, A., Kunimoto, D. (1993). DNA fragment length polymorphism analysis of *Mycobacterium tuberculosis* isolates by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Journal of Infectious Diseases*, 167: 975-978.
- Panton, L. J., Tesh, R. B., Nadeau, K.C., Beverley, S. M. (1991). A test for genetic exchange in mixed infections of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. *Journal of Protozoology*, 38: 224-228.

- Pernin, P. (1984). Isoenzyme patterns of pathogenic and nonpathogenic thermophilic *Naegleria* strains by isoelectric focusing. *International Journal for Parasitology*, 14: 459-465.
- Pernin, P., Cariou, M.L., Jacquier, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationships in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *Journal of Protozoology*, 32: 592-603.
- Pérez-Morga, D., Englund, P.T. (1993). The structure of replicating kinetoplast DNA networks. *The Journal of Cell Biology*, 123: 1069-1079.
- Pesce, A., Saint-Paul, M.C., Vinti, H., Marty, P., Taillan, B., Le Fichoux, Y., Cassuto, J.P. (1990). Leishmaniose gastrique chez un malade atteint de syndrome d'immunodéficience acquise. *La Presse Médicale*, 19: 178.
- Pestov, D.G., Gladkaya, L.A., Maslov, D.A., Kolesnikov, A.A. (1990). Characterization of kinetoplast minicircle DNA in the lower trypanosomatid *Crithidia oncopelti*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 41: 135-146.
- Peters, W., Chance, M.L., Mutinga, M.J., Ngoka, J.M., Schurn, L.F. (1977). The identification of human and animal isolates of *Leishmania* from Kenya. *Annales Tropicales de Médecine et de Parasitologie*, 71:501-502.
- Peters, W., Elbihari, S., Ching Liu, Evans, D.A., Killick-Kendrick, R. (1985). *Leishmania* infecting man and animals in Saudi Arabia. I. General survey. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 831-839.
- Peters, W., Elbihari, S., Evans, D.A. (1986). *Leishmania* infecting man and wild animals in Saudi Arabia. 2. *Leishmania arabica* n. sp. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 497-502.
- Petrillo-Peixoto, M.L., Beverley, S.M. (1988). Amplified DNAs in laboratory stocks of *Leishmania tarentolae*: extrachromosomal circles structurally and functionally similar to the inverted-H-region amplification of methotrexate-resistant *Leishmania major*. *Molecular and Cell Biology*, 8: 5188-5199.
- Petrillo-Peixoto, M.L., Beverley, S.M. (1989). Amplification of a new region of DNA in an unselected laboratory stock of *L. tarentolae*: The T region. *Journal of Protozoology*, 36: 257-261.
- Pfefferkorn, L.C., Pfefferkorn, E.R. (1980). *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. *Experimental Parasitology*, 50: 305-316.
- Pialoux, G., Hennequin, C., Dupont, B., Ravisse, P. (1990). Cutaneous leishmaniasis in an AIDS patient: cured with Itraconazole. *Journal of Infectious Diseases*, 162:1221-1222.
- Piarroux, R., Trouvé, V., Pratlong, F., Martini, A., Lambert, M., Rioux, J.A. (1994). The use of isoelectric focusing on polyacrylamide gel for the enzymatic analysis of "Old World" *Leishmania* species. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 88: 475-478.
- Pires, C., Santos-Gomes, G.M., Pratlong, F., Ribeiro, H., Campino, L., Abranches, P. (1991). Phlébotomes du Portugal. IV. Infestation naturelle de *Phlebotomus ariasi* par *Leishmania infantum* Mon-24 dans le foyer de l'Alto Douro. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 47-48.
- Pittaluga, G. (1912). Hallazgo de *Leishmania infantum* (protozoo parásito del "kala-azar infantil") en la costa de Levante de España. *Boletín del Instituto Nacional de Higiene Alfonso XIII*, 8: 137-139.
- Pittaluga, G. (1913). Leishmaniosis espontánea del perro en la comarca de Tortosa. *Boletín de la Sociedad Española de Biología*, 2: 132-133.

- Porter, C.H., Steurer, F.J., Kreutzer, R.D. (1987). Isolation of *Leishmania mexicana* from *Lutzomyia ylephiletor* in Guatemala.
- Portús, M., Gállego, M., Rioux, J.A., Pratlong, F., Moreno, G., Fisa, R., Gállego, M., Muñoz, C., Riera, C., Sánchez, F., Serra, T. (1989). Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniosis in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 49: 287-289.
- Portús, M., Gállego, M., Seguí, M.G., Sole, J. (1994). Is visceral endemic on the island of Minorca (Spain)? A human visceral case after living 13 years in Minorca. *Parasite*, 1: 87-88.
- Portús, M., Lanotte, G., Pratlong, F. (1982). Observaciones a propósito de un caso de botón de Oriente adquirido en las cercanías de Barcelona. *Actas III Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, p. 35. Madrid.
- Portús, M., Rioux, J.A., Gállego, J., Lanotte, G., Pratlong, F., Moreno, G. (1986). Les leishmanioses en Catalogne (Espagne). A propos de l'identification enzymatique de neuf souches d'origine humaine et canine. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 433-438. IMEEE, Montpellier.
- Pratlong, F., Lanotte, G., Ashford, B.W., Rioux, J.A. (1986). Le complexe *Leishmania tropica*. A propos de l'analyse numérique de 29 souches identifiées par le méthode enzymatique. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 129-137. IMEEE, Montpellier.
- Pratlong, F., Marty, P., Portús, M., Deniau, M., Dereure, J., Abranches, P., Martini, A., Lefebvre, M., Dedet, J.P., Rioux, J.A. (1994). Co-infection *Leishmania*-VIH dans le bassin méditerranéen: caractérisation isoenzymatique de 100 isolats du complexe *Leishmania infantum*. *Congrès de la société Française de Parasitologie*. Toulouse 1-2 Junio.
- Pratlong, F., Portús, M., Rispail, P., Moreno, G., Bastien, P., Rioux, J.A. (1989a). Présence simultanée chez le chien de deux zymodèmes du complexe *Leishmania infantum*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 312-314.
- Pratlong, F., Reynes, J., Dereure, J., Baixench, M.T., Marchou, B., Lefebvre, M., Janbon, F. (1993). Characterization of *Leishmania* isolates from two AIDS patients originating from Valencia, Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87: 705-706.
- Pratlong, F., Rispail, P., Moreno, G., Le Fichoux, Y., Tommasi, C., Périères, J., Rioux, J.A. (1989b). Leishmaniose cutanée a *Leishmania infantum* MON-24, observée a Grasse (Alpes-Maritimes) chez un enfant tunisien. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 506-509.
- Pratlong, F., Rioux, J.A., Dereure, J., Mahjour, J., Gállego, M., Guilvard, E., Lanotte, G., Perieres, J., Martini, A., Saddiki, A. (1991). *Leishmania tropica* au Maroc IV. Diversité isozymique intrafocale. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 100-104.
- Proctor, E.M., Isaac-Renton, J., Boyd, J., Wong, Q., Bowie, W.R. (1989). Isoenzyme analysis of human and animal isolates of *Giardia duodenalis* from British Columbia, Canada. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 41: 411-415.
- Proctor, E.M., Wong, Q., Yang, Y., Keystone, J.S. (1987). The electrophoretic isoenzyme patterns of strains of *Entamoeba histolytica* isolated in two major cities in Canada. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 37: 296-301.
- Procunier, J.D., Fernando, M.A., Barta, J.R. (1993). Species and strain differentiation of *Eimeria* spp. of the domestic fowl using DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers. *Parasitology Research*, 79:

98-102.

Raich, T.J., Archer, J.L., Robertson, M.A., Tabachnick, W.J., Beaty, B.J. (1993). Polymerase chain reaction approaches to *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) identification. *Journal of Medical Entomology*, 30: 228-232.

Ralph, D., McClelland, M., Welsh, J., Baranton, G., Perolat, P. (1993). *Leptospira* species categorized by arbitrarily primed polymerase chain reaction (PCR) and by mapped restriction polymorphisms in PCR-amplified rRNA genes. *Journal of Bacteriology*, 175: 973-981.

Ramírez, J.L., Guevara, P. (1987). The ribosomal gene spacer as a tool in the taxonomy of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22: 177-183.

Ramírez, J.L., Galindo, I. (1990). The chromosomal organization of *Leishmania mexicana*. En: Résumés VII Congrès International de Parasitologie. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie* (Supp. I). (Doby, J.M. Ed.), S1.B15 p.30.

Ranque, P. (1973). Etudes morphologiques et biologiques de quelques trypanosomatidés récoltés au Sénégal. Thesis for the degree of Dr in Sciences Naturelles, Université de Aix-Marseille.

Ranque, J.D., Picard, D., Depieds, R., Roche, R., Ranque, M. (1962). Leishmaniose laryngée autochtone à forma pseudo-tumorale. Note parasitologique et épidémiologique. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine*, 146: 82-86.

Rassam, M.D., Al-Mudhaffer, S.A., Chance, M.L. (1979). Isoenzyme characterization of *Leishmania* species from Iraq. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73: 527-534.

Ravisse, P., Bensimon, G., Lapiorey, G. (1984). Un cas de leishmaniose laryngée de longue évolution. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 77: 305-311.

Ray, D.S. (1987). Kinetoplast DNA minicircles: High-copy-number mitochondrial plasmids. *Plasmid*, 17: 177-190.

Read, A.F., Narara, A., Nee, S., Keymer, A.M., Day, K.P. (1992). Gametocyte sex ratios as indirect measures of outcrossing rates in malaria. *Parasitology*, 104: 387-395.

Ready, P.D., Miles, M.A. (1979). Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 238-242.

Ready, P.D., Smith, D.F., Killick-Kendrick, R. (1988). DNA hybridizations on squash-blotted sandflies to identify both *Phlebotomus papatasi* and infecting *Leishmania major*. *Medical and Veterinary Entomology*, 2: 109-116

Reiner, N.E., R., Lo, R., Llanos-Cuentas, A., Guerra, H., Button, L.L., McMaster, W.R. (1989). Genetic heterogeneity in peruvian *Leishmania* isolates. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 416-421.

Revollo, S., Dimier-David, L., David, C., Lyevre, P., Camacho, C., Dedet, J.P. (1992). Isoenzyme characterization of *Leishmania braziliensis* isolates obtained from Bolivian and Peruvian patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 388-391.

Revollo, S., Carrière, V., Oury, B., Tibayrenc, M. (1994). Implication de la variabilité génétique dans la chimiosensibilité de *Trypanosoma cruzi*. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).

- Ribelles, N., Casals, A., Vallés, J., Clotet, B. (1989). Leishmaniasis visceral de evolución benigna en un paciente infectado por el virus de la inmunodeficiencia humana. *Medicina Clínica (Barcelona)*, 92: 679.
- Richner, D., Schweizer, J., Betschart, B., Jenni, L. (1989). Characterization of West African *Trypanosoma (Trypanozoon) brucei* isolates from man and animals using isoenzyme analysis and DNA hybridization. *Parasitology Research*, 76: 80-85.
- Rider, C.C., Taylor, C.B. (1980). Isoenzymes. (Chapman y Hall Ed.), 79 pp. New York.
- Riera, C., Torras, S., Gállego, M., Fisa, R., Pratlong, F., de colmenares, M., Aisa, M.J., Martini, A., Portus, M. y GCEL. Estudio de la asociación VIH-*Leishmania* en Cataluña durante el periodo 1990-1994 a través de los datos recogidos por el GCEL. (1994). *X Reunión Anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*, p. 9. Sitges, Barcelona.
- Riou, G.R., Yot, P. (1975). Etude de l'ADN kinetoplastique de *Trypanosoma cruzi* à l'aide d'endonucleases de restriction. *Comptes Rendus Société de Biologie*, 280: 2701-2704.
- Rioux, J.A., Albaret, J.L., Houin, R., Dedet, J.P., Lanotte, G. (1968). Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 2. Les reservoirs selvatiques. Infestation spontanée du renard (*Vulpes vulpe* L.). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 43: 421-428.
- Rioux, J.A., Ashford, R.W., Khjami, A. (1992). Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 3. *Leishmania major* infection in *Psammomys obesus* provides clues to life history of the rodent and possible control measures. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 67: 163-165.
- Rioux, J.A., Dereure, J., Khjami, A., Pratlong, F., Sirdar, K., Lambert, M. (1990b). Ecoépidemiologie des leishmanioses en Syrie. 1. Infestation de *Psammomys obesus* cretzenschmar (Rodentia-Gerbillidae) par *Leishmania major* Yakimoff et Schokhor (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 203-207.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Dereure, J., Lanotte, G., Deniat, M., Pratlong, F., Serres, E., Belmonte, A. (1986c). Infestation naturelle de *Phlebotomus papatasi* (Scopoli, 1786) par *Leishmania major* MON-25. A propos de 28 souches isolés dans un foyer du Sud marocain. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 471-478. IMEEE, Montpellier.
- Rioux, J.A., Guilvard, E., Gállego, J., Moreno, G., Pratlong, F., Portús, M., Rispail, P., Gállego, M., Bastien, P. (1986a). *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921 et *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 vecteurs du complexe *Leishmania infantum* dans un même foyer. Infestations par deux zymodèmes syntopiques. A propos d'une enquête en Catalogne (Espagne). En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 439-444. IMEEE, Montpellier.
- Rioux, J.A., Jarry, D.M., Lanotte, G., Maazoun, R., Killick-Kendrick, R. (1984). Ecologie des leishmanioses dans le Sud de la France. 18. Identification enzymatique de *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, isolé de *Phlebotomus ariasi* Tonnoir, 1921, spontanément infesté en Cévennes. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 59: 331-333.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Destombes, P., Vollhardt, Y., Croset, H. (1971). Leishmaniose expérimentale du Renard *Vulpes vulpes* L. *Recueil de Médecine Vétérinaire d'Ecole d'Alfort*, 1947: 489-498.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Maazoun, R., Perello, R., Pratlong, F. (1980). *Leishmania infantum* Nicolle, 1908, agent du bouton d'Orient autochtone. a propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *Comptes Rendus de l'Académie Scientifique de Paris*, 291, série D: 701-703.

- Rioux, J.A., Lanotte, G., Maazoun, R., Pratlong, F. (1982). *Leishmania infantum* responsable du bouton d'Orient dans le sud de l'Espagne. II Conferencia Mediterránea de Parasitología, Granada.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F. (1986d). *Leishmania killicki* n.sp. (Kinetoplastida, Trypanosomatidae). En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 139-132. IMEEE, Montpellier.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Pratlong, F., Dereure, J., Jarry, D., Moreno, G., Killick-Kendrick, R., Perieres, J., Guilvard, E., Belmonte, A., Portús, M. (1985). La leishmaniose cutanée autochtone dans le Sud-Est de la France. Résultats d'une enquête éco-épidémiologique dans les Pyrénées-Orientales. *Médecine et Maladies Infectieuses*, 11: 650.
- Rioux, J.A., Lanotte, G., Serres, E., Pratlong, F., Bastien, P., Perieres, J. (1990a). Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 65: 111-125.
- Rioux, J.A., Moreno, G., Lanotte, G., Pratlong, F., Dereure, J., Rispaël, P. (1986b). Two episodes of cutaneous leishmaniasis in man caused by different zymodemes of *Leishmania infantum* s.l.. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80: 1004-1005.
- Rioux, J.A., Zahaf, A., Lanotte, G., Dereure, J. (1983). *Leishmania major* (Yakimoff et Shokkor, 1914), agent du "Clou de Gafsa". *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 58: 633-634.
- Rivas, L.I., Chicharro, C., Díaz Achirica, P. (1993). Sistemas de unión parásito-célula hospedadora en Trypanosomatidae. En: *Parasitología Molecular. Colección Nuevas Tendencias* vol. 24: 185-216.
- Rivero, A., Santos, J., Márquez, M., Gavilán, J.C., Carralero, C. (1989). Leishmaniasis visceral asociada a infección por el HIV. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 7: 59.
- Rizzi, M., Arici, C., Bonaccorso, C., Gavazzeni, G. (1988). Visceral leishmaniasis in a patient with human immunodeficiency virus. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 565.
- Rizvi, F.S., Ouassii, M.A., Marty, B., Santoro, F., Capron, A. (1988). The major surface protein of *Leishmania* promastigotes is a fibronectin-like molecule. *European Journal of Immunology*, 18: 473-476.
- Roig, R., Salavert, M., Navarro, V., Nieto, A., Millán, F., Grau, M. (1989). Leishmaniasis en paciente con infección por VIH y tuberculosis pulmonar. ¿Más allá del hecho casual?. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 7: 338-339.
- Rogers, W.O., Burnheim, P.F., Wirth, D.F. (1988). Detection of *Leishmania* within sand flies by kinetoplast DNA hybridization. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 39: 434-439.
- Rogers, W.O., Wirth, D.F. (1987). Kinetoplast DNA minicircles: regions of extensive sequence divergence. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 84: 565-569.
- Rogers, W.O., Wirth, D.F. (1988). Generation of sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Leishmania mexicana mexicana amazonensis*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 30: 1-8.
- Roitman, L., Mundim, M.H., De Axevedo, H.P., Kitajima, E.W. (1977). Growth of *Crithidia* at high temperature *Crithidia humeri* sp.n. and *Crithidia lucilae* *termophila* new subspecies. *Journal of Protozoology*, 24: 553-556.
- Rollinson, D., Joyner, L.P., Norton, C.C. (1979). *Eimeria maxima*: the use of enzyme markers to detect the genetic transfer of drug resistance between lines. *Parasitology*, 71: 369-376.

- Romanha, A.J., Brener, Z. (1988). *Trypanosoma cruzi* isoenzyme pattern as an epidemiological tool. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83: 383-386.
- Romero, G.G., Arana, M., López, M., Montoya, I., Bohl, R., Campos, M., Arevalo, J., Llanos, A. (1987). Characterization of *Leishmania* species from Peru. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 81: 14-24.
- Rosenthal, E., Marty, P., Gueniffey, D., Dujardin, P., Dellamonica, P., Cassuto, J.P. (1993). *Leishmania infantum* and HIV-1 coinfection in south-eastern France. En: *Abstract Book (Volume I) of IX International Conference on AIDS*. Berlin. p. 388.
- Ross, R. (1903). (1) Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan and (2) further notes on Leishman's bodies. *British Medical Journal*, 2: 1261-1401.
- Rossi, V., Wincker, P., Ravel, C., Blaineau, C., Pagés, M., Bastien, P. (1994). Structural organization of microsatellite families in the *Leishmania* genome and polymorphisms at two (CA)_n loci. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65: 271-282.
- Russell, D.G., Wilhelm, H. (1986). The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *Journal of Immunology*, 136: 2613-2620.
- Russell, D.G., Wirght, S.D. (1988). Complement receptor type 3 (CR3) binds to an ARg-Gly-Asp containing region of the major surface glycoprotein, gp63, of *Leishmania* promastigotes. *Journal of Experimental Medicine*, 168: 279-292.
- Ryan, K.A., Shapiro, T.A., Rauch, C.A., Englund, P.T. (1988). Replication of kinetoplast DNA in Trypanosomes. *Annual Reviews of Microbiology*, 42: 339-358.
- Sacks, D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Experimental Parasitology*, 69: 100-103.
- Safjanova, W.M. (1982). Classification of the genus *Leishmania*. Ross. En: *Leishmania. Protozoology, Part 7, Academy of Sciences, URSS All Union Society of Protozoologists, Leningrad*, pp 220.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.
- Samaras, N., Spithill, T.W. (1987). Molecular karyotype of five species of *Leishmania* and analysis of gene locations and chromosomal rearrangements. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 25: 279-291.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Sanderson, A., Walliker, D. (1981). Enzyme typing of *Plasmodium falciparum* from African and some other Old World countries. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 263-267.
- Santrich, C., Segura, I., Arias, A.L., Saravia, N.G. (1990). Mucosal disease caused by *Leishmania braziliensis guyanensis*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 42: 52-55.
- Saravia, N.G., Holguín, A.F., McMahon-Pratt, D., D'Alessandro, A. (1985). Mucocutaneous leishmaniasis in Colombia: *Leishmania braziliensis* subspecies diversity. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 714-720.
- Sargeaunt, P.G. (1985). Zymodemes expressing posible genetic exchange in *Entamoeba histolytica*.

Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 79: 86-89.

Sargeaunt, P.G. (1987a). Zymodemes of *Entamoeba histolytica*. *Parasitology Today*, 3: 158.

Sargeaunt, P.G. (1987b). The reliability of *Entamoeba histolytica* in clinical diagnosis. *Parasitology Today*, 3: 40-43.

Sargeaunt, P.G., Baveja, U.K., Nanda, R., Anand, B.S. (1984). Influence of geographical factors in the distribution of pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica*: identification of zymodeme XIV in India. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 96-101.

Sargeaunt, P.G., Jackson, T.F.H.G., Simjee, A. (1982c). Biochemical homogeneity of *Entamoeba histolytica* isolates, especially those from liver abscess. *Lancet*, pp.1386-1388.

Sargeaunt, P.G., Jackson, T.F.H.G., Wiffen, S.R., Bhojnani, R. (1988). Biological evidence of genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 82: 862-867.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. (1978). Electrophoretic isoenzyme patterns of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba coli*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 164-165.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. (1979). Electrophoretic isoenzyme patterns of the pathogenic and non-pathogenic intestinal amoebae of man. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 73: 225-227.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. (1980a). The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in Mexico city. A pilot survey I. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 653-656.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E. (1980b). A comparative study of *Entamoeba histolytica* (NIH 200, HK9, etc), "E. histolytica-like" and other morphologically identical amoebae using isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 469-474.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Bhojnani, R., Campos, J.E., Gómez, A. (1982a). The epidemiology of *Entamoeba histolytica* in a rural and an urban area of Mexico. A pilot survey II. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 208-210.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Grene, J.D. (1978). The differentiation of invasive and non-invasive *Entamoeba histolytica* by isoenzyme electrophoresis. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 72: 519-521.

Sargeaunt, P.G., Williams, J.E., Jackson, T.F.H.G., Simjee, A.E. (1982b). A zymodeme study of *Entamoeba histolytica* in a group of South African schoolchildren. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76: 401-402.

Saulnier, P., Bourneix, C., Prevost, G., Andremont, A. (1993). Random amplified polymorphic DNA assay is less discriminant than pulsed-field gel electrophoresis for typing strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 982-985.

Scaglia, M., Gatti, S., Bruno, A., Cevini, C. (1991). Autochthonous amoebiasis in institutionalized mentally-retarded patients: preliminary evaluation of isoenzyme patterns in three isolates. *Annals of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 509-513.

Scheffter, S., Widmer, G., Patterson, J.L. (1994). Complete sequence of *Leishmania* RNA virus 1-4 and identification of conserved sequences. *Virology*, 199: 479-483.

- Schnare, M.N., Collings, J.C., Gray, M.W. (1986). Structure and evolution of the small subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. *Current Genetics*, 10: 405-410.
- Schnur, L.F., Chance, M.L., Ebert, F., Thomas, S.C., Peters, W. (1981). The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 73: 131-144.
- Schnur, L.F., Le Blancq, S. M. (1986). The serological and enzymological characterization of aetiological agents of leishmaniasis in Israel. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 347-355. IMEEE, Montpellier.
- Scholler, J.K., Reed, S.G., Stuart, K. (1986). Molecular karyotype of species and subspecies of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 20: 279-293.
- Schoone, G.J., Van Eys, G.J.J.M., Ligthart, G.S., Taub, F.E., Zaal, J., Mebrahtu, Y., Laywer, P. (1991). Detection and identification of *Leishmania* parasites by *in situ* hybridization with total and recombinant DNA probes. *Experimental Parasitology*, 73: 345-353.
- Schwartz, D.C., Cantor, Ch. R. (1984). Separation of yeast chromosome-size DNAs by pulse field gradient gel electrophoresis. *Cell*, 36: 67-75.
- Schweizer, J., Pospichal, H., Hide, G., Buchanan, N., Tait, A., Jenni, L. (1994). Analysis of a new genetic cross between two East African *Trypanosoma brucei* clones. *Parasitology*, 109: 83-93.
- Scott, P.A., Sher, A. (1993). Immunoparasitology. En: *Fundamental Immunology*. Third Edition. (William E. Paul Eds.). Raven Press. Ltd. New York. Chapter 33: 1179-1210.
- Selander, R.K., Caugant, D.A., Ochman, H., Musser, J.M., Gilmour, M.N., Whittam, T.S. (1986). Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Applied and Environmental Microbiology*, 51: 873-884.
- Senaldi, G., Cadeo, G., Carnevale, G., di Perri, G., Carosi, G. (1986). Visceral leishmaniasis as an opportunistic infection. *Lancet*, ii: 1094.
- Serra, T., Dedet, J.P., Pratlong, F., Ramírez, A., Arteaga, E., Altés, J., Gallegos, C., Sanchez, J. y GELB. Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en las Islas Baleares. *X Reunión anual de la Asociación de Parasitólogos Españoles*. p. 11. Sitges, Barcelona.
- Serres, E., Roux, M. (1986). Pratique de la classification automatique: l'exemple de *Leishmania*. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 27-40. IMEEE, Montpellier.
- Shaw, J.J., Ishikawa, E.A.Y., Lainson, R., Braga, R.R., Silveira, F.T. (1991). Cutaneous leishmaniasis of man due to *Leishmania (Viannia) shawi* Lainson, De souza, Póvoa, Ishikawa y Silveira, in Pará State, Brazil. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 66: 243-246.
- Shehata, M., El Sattar, S., Morsy, T., El Sawaf, B. (1991). Experimental dual infection of *Leishmania* in *Phlebotomus langeroni* (Diptera: Psychodidae). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 85: 739-740.
- Shetata, M., El Sawaf, B., El Said, S., Doha, S., El Hosary, S., Kamal, H., Dereure, J., Pratlong, F., Rioux, J.A. (1990). *Leishmania infantum* MON-98 isolated from dogs in El Agamy, Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 227-228.
- Shlomai, J. (1994). The assembly of kinetoplast DNA. *Parasitology Today*, 9: 341-346.

- Shurkhal, A.V., Kellina, O.I., Passova, O.M., Strelkova, M.V., Rakitskaya, T.K. (1986). Preliminary results of comparative studies on biochemical gene markers in *Leishmania* at species, strain and clone levels. En: *Leishmania*. Taxonomie et phylogénèse. Applications éco-épidémiologiques. (Coll. int. CNRS/INSERM, 2-6 juillet 1984). (Rioux, J.A. Ed.). pp. 91-104. IMEEE, Montpellier.
- Siles-Lucas, M., Cuesta-Bandera, C., Cesar-Benito, M. (1993). Random amplified polymorphic DNA technique for speciation studies of *Echinococcus granulosus*. *Parasitology Research*, 79: 343-345.
- Silveira, F.T., Shaw, J.J., Braga, R.R., Ishikawa, E. (1987). Dermal leishmaniasis in the amazon region of Brazil: *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* sp. n., a new parasite from the state of Pará. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82: 289-292.
- Simpson, L. (1972). The kinetoplast of hemoflagellates. *International Review of Cytology*, 32: 139-207.
- Simpson, L. (1979). Isolation of maxicircle componente of kinetoplast DNA from hemoflagellate protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 76: 1585-1588.
- Simpson, L., Braly, P. (1970). Synchronization of *Leishmania tarentolae* by Hydroxyurea. *Journal of Protozoology*, 17: 511-517.
- Simpson, L., da Silva, A. (1971). Isolation and characterization of kinetoplast DNA from *Leishmania tarentolae*. *Journal of Molecular Biology*, 56: 443-473.
- Simpson, L., Simpson, A.M. (1978). Kinetoplast RNA of *Leishmania tarentolae*. *Cell*, 14: 169-178.
- Simpson, L., Simpson, A.M., Kidane, G., Livingston, L., Spithill, T.W. (1980). The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 29: 1053-1063.
- Smith, D.F., Searle, S., Ready, P.D., Gramiccia, M., Ben-Ismaïl, R. (1989). A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania major*: sequence homologies between regions of *Leishmania* minicircles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37: 213-224.
- Smith, J.M., Meerovitch, E. (1985). Primates as a source of *Entamoeba histolytica*, their zymodeme status and zoonotic potential. *Journal of Parasitology*, 71: 751-756.
- Smith, J.M., Smith, N. H., O'Rourke, M., Spratt, B.G. (1993). How clonal are bacteria?. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 4384-4388.
- Smithies, O. (1955). Zone electrophoresis in starch gels: Group variations in the serum proteins of normal individuals. *Biochemical Journal*, 61: 629-641.
- Sogin, M.L., Elwood, H.J., Gunderson, H.J. (1986). Evolutionary diversity of eukaryotic small subunit ribosomal RNA gene of *Crithidia fasciculata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 1383-1387.
- Solari, A., Muñoz, S., Venegas, J., Wallace, A., Aguilera, X., Apt, W., Brenière, S.F., Tibayrenc, M. (1992). Characterization of Chilean, Bolivian, and Argentinian *Trypanosoma cruzi* populations by restriction endonuclease and isoenzyme analysis. *Experimental Parasitology*, 75: 187-195.
- Soliman, M.A., Ackers, J.P., Catterall, R.D. (1982). Isoenzyme characterization of *Trichomonas vaginalis*. *British Journal Venereal Diseases*, 58: 250-256.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 98: 503-517.

- Southern, E.M., Anand, R., Brown, W.R.A., Fletcher, D.S. (1987). A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 15: 5925-5943.
- Spithill, T.W., Grumont, R.J. (1984). Identification of species, strains and clones of *Leishmania* by characterization of kinetoplast DNA minicircles. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 12: 217-236.
- Spithill, T. W., Samaras, N. (1985). The molecular karyotype of *Leishmania major* and mapping of α and β -tubulin gene families to multiple unlinked chromosomal loci. *Nucleic Acids Research*, 13: 4155-4169.
- Spithill, T. W., Samaras, N. (1987). Genomic organization, chromosomal location and transcription of dispersed and repeated tubulin genes in *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24: 23-37.
- Steindel, M., Dias Neto, E., de Menezes, C.L.P., Romanha, A.J., Simpson, A.J.G. (1993). Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 60: 71-80.
- Steiner, M., Van Assel, S. (1980). Sequence heterogeneity in kinetoplast DNA: Reassociation kinetics. *Plasmid*, 3: 7-17.
- Sternberg, J., Tait, A., Haley, S., Wells, J.M., Le Page, R.W.F., Schweizer, J., Jenni, L. (1988). Gene exchange in African trypanosomes: characterization of a new hybrid genotype. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27: 191-200.
- Sternberg, J., Turner, C.M.R., Wells, J.M., Ranford-Cartwright, L.C., Lepage, R.W.F., Tait, A. (1989). Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34: 269-280.
- Stranden, A.M., Eckert, J., Köhler, P. (1990). Electrophoretic characterization of *Giardia* isolated from humans, cattle, sheep, and a dog in Switzerland. *Journal of Parasitology*, 76: 660-668.
- Strelkova, M.V., Shurkhal, A.V., Kellina O, I., Eliseev, L.N., Evans, D.a., Peters, W., Chapman, C.J., Le Blancq, S.M., Van Eys, G.J.J.M. (1990). A species of *Leishmania* isolated from the great gerbil *Rhombomys opimus*. *Parasitology*, 101: 327-335.
- Stuart, K.D. (1991). Circular and linear multicopy DNAs in *Leishmania*. *Parasitology Today*, 7: 158-159.
- Stuart, K.D.; Tarr, P., Aline Jr., R., Smiley, B., Scholler, J., Keithly, J. (1989). Small nucleic acids in *Leishmania*. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control* (Hart, D.T. ed.), pp. 555-562, Plenum Press. New York.
- Stuart, K.D., Weeks, R., Myler, P.J. (1992). Molecular organization of *Leishmania* RNA virus 1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 89: 8596-8600.
- Tait, A. (1980). Evidence for diploidy and mating in trypanosomes. *Nature*, 287: 536-538.
- Tait, A. (1990). Genetic exchange and evolutionary relationships in protozoan and helminth parasites. *Parasitology*, 100: S75-S87.
- Tait, A., Babiker, E.A., Le Ray, D. (1984). enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. *Parasitology*, 89: 311-326.
- Tait, A., Barry, J.D., Wink, R., Sanderson, A., Crowe, J.S. (1985). Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* s.s.p. II. Evidence for *Trypanosoma brucei rhodesiense* being a set of variants of *Trypanosoma brucei brucei*. *Parasitology*, 90: 89-100.

- Tait, A., Turner, C.M.R., Le Page, R.W. F., Wells, J.M. (1989). Genetic evidence that metacyclic forms of *Trypanosoma brucei* are diploid. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 37: 247-256.
- Tait, A., Turner, C.M.R. (1990). Genetic exchange in *Trypanosome brucei*. *Parasitology Today*, 3: 70-75.
- Takayanagi, T., enriques, G.L., Kambara, H. (1971). An electrophoretic study of the amylase of *Trichomonas vaginalis*. *S.E. Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, 2: 308-312.
- Tarr, P.I., Aline, R.F., Smiley, B.L., Scholler, J., Keithli, J., Stuart, K. (1988). LR1: a candidate RNA virus of *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85: 9572-9575.
- Tavares, C.C., Grimaldi, G., Traub-Cseko, Y.M. (1992). Molecular karyotype analysis and mapping of housekeeping genes to chromosomes of selected species complexes of *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87: 477-486.
- Texeira, L.F., Gonçalves, A.M., Romanhna, A.J., Steindel, M., Pinto, A.S. (1993). Schizodeme and zymodeme analysis of trypanosomes of the subgenus *Schyzotrypanum* from the bat. *Parasitology Research*, 79: 497-500.
- Thaithong, S., Sueblinwong, T., Beale, G.H. (1981). Enzyme typing of some isolates of *Plasmodium falciparum* from Thailand. *Transactions of The Royal Tropical Medicine and Hygiene*, 75: 268-270.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E. (1993a). Phylogenetic taxonomy of New World *Leishmania*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68: 104-106.
- Thomaz-Soccol, V., Lanotte, G., Rioux, J.A., Pratlong, F., Martini-Dumas, A., Serres, E. (1993b). monophyletic origin of the genus *Leishmania* Ross, 1903. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68: 107-108.
- Thompson, R.C.A. (1988). Intraspecific variation and epidemiology. En: *Parasitology in Focus* (Mehlhorn, H. ed.), pp. 391-411, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Tibayrenc, M. (1985). On the microdistribution and sexuality of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 882.
- Tibayrenc, M. (1992). *Leishmania*: sex, karyotypes and population genetics. *Parasitology Today*, 8: 305-306.
- Tibayrenc, M. (1993). Clonality in *Leishmania*. *Parasitology Today*, 9: 58.
- Tibayrenc, M. (1994). Sexe, évolution et typage de souches chez les microorganismes. En: *Symposium "Outils de la Biologie Moléculaire en Parasitologie pour le diagnostic, la biosystématique et la génétique des populations"*. Orleans, 23-25 Mars (France).
- Tibayrenc, M., Ayala, F.G. (1987). *Trypanosoma cruzi* populations: more clonal than sexual. *Parasitology Today*, 3: 189-190.
- Tibayrenc, M., Ayala, F.J. (1991). Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. *Parasitology Today*, 7: 328-332.
- Tibayrenc, M., Ben Abderrazak, S. (1993). Apport de la génétique des populations au problème du typage des souches de parasites. *Bulletin de liaison et documentation- OCEAC*, 26: 121-123.
- Tibayrenc, M., Desjeux, P. (1983). The presence in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi*

circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. *Transactions of The Royal Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 73-75.

Tibayrenc, M., Echalar, L., Dujardin, J.P., Poch, O., Desjeux, P. (1984). The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 78: 519-525.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Ayala, F.J. (1990). A clonal theory of parasitic protozoa: The population structure of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas* and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 87: 2414-2418.

Tibayrenc, M., Kjellberg, F., Arnaud, J., Oury, B., Brenière, S.F., Dardé, M-L., Ayala, F.J. (1991). Are eukaryotic microorganisms clonal or sexual? A population genetics vantage. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 88: 5129-5133.

Tibayrenc, M., Miles, M.A. (1983). A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 77: 76-83.

Tibayrenc, M., Neubauer, K., Barnabé, C., Guerrini, F., Skarecky, D., Ayala, F.J. (1993). Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 90: 1335-1339.

Tibayrenc, M., Ward, P., Moya, A., Ayala, F.J. (1986). Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83: 115-119.

Tighe, P.J., Goyal, P.K., Wilson, Z.A., Wakelin, D., Pritchard, D.I. (1994). analysis of genetic variation in isolates of *Trichinella* using random amplified polymorphic DNA. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 63: 175-178.

Tripp, C.A., Myler, P.J., Stuart, K. (1991). A DNA sequence (LD1) which occurs in several genomic organizations in *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 47: 151-160.

Tripp, C.A., Wisdom, W.A., Myler, P.J., Stuart, K.D. (1992). A multicopy, extrachromosomal DNA in *Leishmania infantum* contains two inverted repeats of the 27,5-kilobase LD1 sequence and encodes numerous transcripts. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 55: 39-50.

Truc, P., Tibayrenc, M. (1993). Population genetics of *Trypanosoma brucei* in Central Africa: taxonomic and epidemiological significance. *Parasitology*, 106: 137-149.

Turner, C.M.R., Stenberg, J., Buchanan, N., Smith, E., Hide, G., Tait, A. (1990). Evidence that the mechanism of gene exchange in *Trypanosoma brucei* involves meiosis and syngamy. *Parasitology*, 101: 377-386.

Tzamouranis, N., Schnur, L., F., Garifallou, A., Pateraki, E., Série, C. (1984). Leishmaniasis in Greece I. Isolation and identification of the parasite causing human and canine visceral leishmaniasis. *Annales of Tropical Medicine and Parasitology*, 78: 363.

Uliana, S.R.B., Affonso, M.H.T., Camargo, E.P., Floeter-Winter, L.M. (1991). *Leishmania* genus identification based on a specific sequence of the 18S ribosomal RNA sequence. *Experimental Parasitology*, 72: 157-163.

Ullman, B., Carrero-Valenzuela, E., Coons, T. (1989). *Leishmania donovani*: Isolation and characterization

- of sodium stibogluconate (Pentostam)-resistant cell lines. *Experimental Parasitology*, 69: 157-163.
- Urgel, R., Recacoechea, M., Desjeux, Ph., Bermudez, H., Villarroel, G., Balderrama, S., Carrasco, J., Aguilar, C., Dujardin, J.C., Le Ray, D. (1989). Leishmaniasis in the lowlands of Bolivia (Leishbol): Part VII. Preliminary characterization of eleven leishmania isolates. En: *Leishmaniasis: The Current Status and New Strategies for Control*. (Hart, D.T. ed.), pp. 131-136, Plenum Press. New York.
- Van Bueren, J., Hodson, S., Miles, M.A., Neal, R.A. (1989). Zymodeme analysis of laboratory strains of *Trypanosoma cruzi* in relation to drug susceptibility. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 207.
- Van der Ploeg, L.H.T., Cornelissen, A.W.C.A., Barry, I.D., Borst, P. (1984). Chromosomes of kinetoplastida. *The Embo Journal*, 3: 3109-3115.
- Van Eys, G.J.J.M., Guizani, I., Ligthart, G.S., Dellagi, K. (1991). A nuclear DNA probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Experimental Parasitology*, 72: 459-463.
- Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Ligthart, G.S., Alvar, J., Evans, D.A., Terpstra, W.J. (1989). Identification of "Old World" *Leishmania* by DNA recombinant probes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34: 53-62.
- Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Kroon, N.C.M., Ebeling, S.B. (1992). Sequence analysis of small subunit ribosomal RNA genes and its use for detection and identification of *Leishmania* parasites. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 51: 133-142.
- Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Kroon, C.C.M., Ligthart, G.S. (1990). PCR in epidemiology and diagnosis. *Second CEC meeting on leishmania: Field work, epidemiology, diagnosis and intervention*. pp. 42. Macuto, Venezuela.
- Van Eys, G.J.J.M., Schoone, G.J., Ligthart, G.S., Laarman, J.J., Terpstra, W.J. (1987). Detection of *Leishmania* parasites by DNA in situ hybridization with non-radioactive probes. *Parasitology Research*, 73: 199-202.
- Vargas, M.A., Orozco, E. (1993). *Entamoeba histolytica*: changes in the zymodeme of cloned nonpathogenic trophozoites cultured under different conditions. *Parasitology Research*, 79: 353-356.
- Vasconcelos, I.A.B., Vasconcelos, A.W., Momen, H., Grimaldi Jr., G., Alencar, J.E. (1988). epidemiological studies on american leishmaniasis in Ceará State, Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 82: 547-554.
- Verdejo, J., Alvar, J., Polo, R.M., González-Lahoz, J.M. (1987). Leishmaniasis visceral asociada a anti-HTLV III positivo. *Revista Clínica Española*, 180: 221.
- Verdejo, J., Alvar, J., Polo, R.M., González-Lahoz, J.M. (1988). Glucantime-resistant visceral leishmaniasis in immunocompromised patients. *American Journal of Medicine*, 85: 128.
- Vigevani, G.M., Galli, M., Rizzardini, G., Antinori, S., Almaguiera, M., Coen, M. (1989). Visceral leishmaniasis in HIV infection: a report of three cases. *Aids*, 3: 674-675.
- Vickerman, K., Preston, T.M. (1970). Spindle microtubules in the dividing nuclei of trypanosomes. *Journal of Cell Science*, 6: 365-384.
- Villalba, E., Ramírez, J.L. (1982). Ribosomal DNA of *Leishmania brasiliensis*: Number of ribosomal copies and gene isolation. *Journal of Protozoology*, 29: 438-441.

- Vobra, H., Bhatti, N.K., Ganguly, N.K., Mahajan, R.C. (1989). Virulence of pathogenic and non-pathogenic zymodemes of *Entamoeba histolytica* (Indian strains) in guinea-pigs. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 83: 648-650.
- Vrchotová, N., Ditrich, O., Giboda, M. (1993). change of isoenzyme pattern during long-term polyxenic cultivation of *Entamoeba histolytica*. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 68: 67-69.
- Wahba, M.M., Schnur, L.F., Morsy, T.A., Merdan, A. (1990). the characterization of *Leishmania major* from PPhlebotomus papatasi (Scopoli) caught in northern Sinai, Egypt. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 84: 784-785.
- Waitumbi, J.N., Murphy, N.B. (1993). Inter- and intra-species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 58: 181-186.
- Wallace, F.G., Camargo, E.P., McGhee, B.B., Roitman, I. (1983). Guidelines for the description of new species of lower trypanosomatids. *Journal of Protozoology*, 30: 308-313.
- Walliker, D. (1983). The genetic basis of diversity in malaria parasites. *Adv. Parasitology*, 22: 217-259.
- Walliker, D., Quakyl, I.A., Wellems, T.E., McCutchan, T.F., Szarman, A., London, W.T., Corcoran, L.M., Burkot, T.R., Carter, R. (1987). Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science*, 236: 1661-1666.
- Walliker, D. (1989). Implications of genetic exchange in the study of protozoan infections. *Parasitology*, 99: S49-S58.
- Weigle, K.A., Saravia, N.G., de Dávalos, M., Moreno, L.H., D'Alessandro, A. (1986). *Leishmania braziliensis* from the pacific coast region of Colombia: foci of transmission, clinical spectrum and isoenzyme phenotypes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 35: 722-731.
- Weislogel, P.O., Hoeijmakers, A.H., Fairlamb, C., Kleisen, C., Borst, P. (1977). Characterization of kinetoplast DNA networks from the insect trypanosome *Crithidia lucilae*. *Biochemical Biophysics Acta*, 478: 167-179.
- Welsh, J., McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 18: 7213-7218.
- Welsh, J., Pretzman, C., Postic, D., Saint giron, I., Baranton, G., McClelland, M. (1992). Genomic fingerprinting by arbitrarily primed polymerase chain reaction resolves *Borrelia burgdorferi* into three distinct phyletic groups. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 42: 370-377.
- Wells, J.M., Prospero, T.D., Jenni, L., Le Page, R.W.F. (1987). DNA contents and molecular karyotypes of hybrid *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 24: 103-116.
- Webster, H.K., Thaithong, S., Pavanand, K., Yongvanitchit, K., Pinswaasdi, C., Boudreau, E.F. (1985). Cloning and characterization of mefloquine-resistant *Plasmodium falciparum* from Thailand. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 34: 1022-1027.
- White, T.C., Fase-Fowler, F., van Luenen, H., Calafat, J., Borst, P. (1988). The H-circles of *Leishmania tarentolae* are a unique amplifiable system of oligomeric DNAs associated with drug resistance. *Journal Biological Chemistry*, 263: 16977-16983.
- Wilson, K., Hanson, S., Landfear, S., Ullman, B. (1991). Nucleotide sequence of *Leishmania donovani* medRNA gene. *Nucleic Acids Research*, 19: 5787.
- Wilson, S.M. (1992). Reply. *Parasitology Today*, 8: 235.

- Wilson, S.M., McNervey, R., Moreno, M.B., Frame, I., Miles, M.A. (1992). Adaptation of a radioactive *L. donovani* complex DNA probe to a chemiluminescent detection system gives enhanced sensitivity for diagnostic and epidemiological applications. *Parasitology*, 104: 421-426.
- Williams, J.G.K., Hanafey, M.K., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1993). Genetic analysis using RAPD markers. *Methods in Enzymology*, 218: 704-740.
- Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A., Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18: 6531-6535.
- Wirth, D.F., McMahon Pratt, D. (1982). Rapid identification of *Leishmania* species by specific hybridization of kinetoplast DNA in cutaneous lesions. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 79: 6999-7003.
- Wirth, D.F., Rogers, W.O., Barker, R. Jr., Dourado, H., Suesebang, L., Albuquerque, B. (1986). Leishmaniasis and Malaria: New tools for epidemiologic analysis. *Science*, 234: 975-979.
- Woods, J.P., Kersulite, D., Goldman, W.E., Berg, D.E. (1993). Fast DNA isolation from *Histoplasma capsulatum*: Methodology for arbitrary primer polymerase chain reaction-based epidemiological and clinical studies. *Journal of Clinical Microbiology*, 31: 463-464.
- World Health Organization (1990). Control of the leishmaniases. *World Health Organization Technique Report Serie 793*.
- Yebra, M., Segovia, J., Manzano, L., Vargas, J.A., Bernaldo de Quirós, L., Alvar, J. (1988). Disseminated-to-skin Kala-azar and the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 108: 490-491.
- Youssef, M., Shetata, M.G., El Sawaf, B.M., Boulos, L., Pratlong, F., Amer, M., Rioux, J.A. (1989). *Leishmania infantum* MON-98, zymodème nouveau isolé des leishmanioses viscérales humaines en Egypte (El Agamy). *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 64: 152-153.
- Ziegler, A., Geiger, K.H., Ragoussis, J., Szalay, G. (1987). A new electrophoresis apparatus for separating very large DNA molecules. *Journal Clin. Chem. Clin. Biochem.* 25:578-579.

8.- ANEXO

- 1.- Jiménez, M.I., Gutiérrez-Solar, B., Benito, A., Aguiar, A., García, E., Cercenado, E., Alvar, J. (1991). *Research and Reviews in Parasitology*, 51: 95-99.
- 2.- Molina, R., López-Vélez, R., Gutiérrez-Solar, B., Jiménez, M.I., Alvar, J. (1992). Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86: 516.
- 3.- Jiménez, M.I., Puente, S., Gutiérrez-Solar, B., Martínez, P., Alvar, J. (1994). Visceral leishmaniasis in Angola due to *Leishmania (Leishmania) infantum*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54: 687-692.
- 4.- Alvar, J., Jiménez, M.I. (1994). Could infected drugs-abusers act as potential *L. (L.) infantum* reservoirs?. *Aids*, 8: 854.
- 5.- Jiménez, M.I., Laguna, F., Solís, F., Alvar, J. (1994). New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in HIV-positive co-infected patients from Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, (en Prensa).

CUTANEOUS *LEISHMANIA (L.) INFANTUM* ZYMODEMES ISOLATED FROM BONE MARROW IN AIDS PATIENTS

M.I. JIMÉNEZ¹, B. GUTIÉRREZ-SOLAR¹, A. BENITO¹, A. AGUIAR¹,
E. GARCÍA¹, E. CERCENADO² & J. ALVAR¹

¹Laboratorio de Referencia de Leishmaniosis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología,
Instituto de Salud «Carlos III», 28220 Majadahonda, Madrid, Spain

²Hospital Gregorio Marañón, Madrid, Spain

Received 29 May 1991; accepted 7 June 1991

REFERENCE: JIMÉNEZ (M.I.), GUTIÉRREZ-SOLAR (B.), BENITO (A.), AGUIAR (A.), GARCÍA (E.), CERCENADO (E.) & ALVAR (J.), 1991.— Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, 51 (1-4): 95-99.

ABSTRACT: The interest in immunocompromising diseases and leishmaniasis association has increased due to the accumulation of leishmaniasis cases among AIDS patients. In Spain, *Leishmania infantum* is responsible for both cutaneous and visceral pathologies: cutaneous stocks are correlated with the zymodemes MON-1, MON-29 and MON-33, and visceral stocks with MON-1, MON-28 and MON-80. In order to verify whether the parasite involved in this peculiar association is biologically identical to the isolates present in common leishmaniasis, eight *Leishmania* stocks from AIDS patients were isolated and characterized from both cutaneous and visceral lesions. For the parasite typing, two methods were carried out: isoenzyme analysis using a 15 enzyme panel in thick starch gels and karyotyping by pulsed field gradient electrophoresis (PFG). Both cutaneous and visceral isolates showed isoenzyme patterns specific for *L. infantum*, reinforcing the previous reports of *L. infantum* as the single *Leishmania* species present in Spain. Both cutaneous and visceral zymodemes were isolated from bone marrow aspirates: the anergic condition in AIDS patients permits the dissemination of the parasite throughout the viscera and skin. A high variability has been shown for most of the isolated by PFG typing, except two stocks which share the majority of chromosome bands. None of the methods used identified a single microbiological or epidemiological marker for *Leishmania* stocks isolated from HIV-infected patients. Therefore, it is the same parasite as in usual leishmaniasis but the infection ratio is amplified by the immunodeficiencies.

KEY WORDS: *Leishmania infantum*, AIDS, coinfection, characterization.

INTRODUCTION

The first case of leishmaniasis associated with HIV was published in 1985 (DE LA LOMA *et al.*, 1985). Since then, over one hundred-twenty more cases have been described, most of them in Spain (FERNÁNDEZ-GUERRERO *et al.*, 1987; ALVAR, BLÁZQUEZ & NÁJERA, 1989a; MONTALBÁN *et al.*, 1989; BERENGUER *et al.*, 1989; WHO, 1991). So there are good reasons to consider *Leishmania* to be an opportunistic parasite inside the host long before the HIV infection: a) once the immunosuppression appeared, some of the clinically cured cutaneous cases have evolved into visceral leishmaniasis; b) leishmaniasis can appear either in early or late HIV infection without correlation with the serological response; c) there is a strong correlation between leishmaniasis and AIDS, even when both infections overlap in restricted areas; d) the skin test shows the persistence of delayed hypersensitivity for many years; e) there is a long delay between exposition to the parasite and clinical symptoms, in some cases over five years (BADARÓ *et al.*, 1986; SENALDI *et al.*, 1986; ALVAR & BLÁZQUEZ, 1986).

In Southwest Europe, *L. infantum* is responsible for both cutaneous and visceral forms of leishmaniasis. Zymodeme (ZM) 1 (MON-1), ZM-29 (MON-29) and ZM-33 (MON-33) are correlated with cutaneous stocks and ZM-1 (MON-1), ZM-28 (MON-28) and ZM-80 (MON-80) with visceral isolates, all of them described in Spain (RIOUX *et al.*, 1980; PORTÚS *et al.*, 1986; ALVAR & ORTIZ, 1987; PORTÚS *et al.*, 1989).

The above-mentioned tropism of the different zymodemes establishes new epidemiological and clinical frontiers in the understanding of leishmaniasis. In order to define whether the parasite isolates from AIDS patients belong to a group with typical characteristics or not, two taxonomical methods in eight *Leishmania* stocks from AIDS patients presenting either cutaneous or visceral lesions were performed.

MATERIAL AND METHODS

Stocks

Eight *Leishmania* stocks were isolated by biopsy or aspirate in NNN medium and sequentially passed into RPMI-12%FCS. Seven of them were obtained from bone marrow in visceral leishmaniasis, and one from diffuse cutaneous leishmaniasis. All patients were from Madrid. International reference species and zymodeme markers were used (see Table 1).

Enzyme analysis

The isoenzyme patterns were obtained by 15 systems: GPI (E.C.5.3.1.9), G-6-PD (E.C.1.1.1.49), 6-PGD (E.C.1.1.1.44), NPI (E.C.2.4.2.1) and NP2 (E.C.2.4.2.*), MDH (E.C.1.1.1.37), GOT1 (E.C.2.6.1.1) and GOT2 (E.C.2.6.1.*), ME (E.C.1.1.1.40), ICD (E.C.1.1.1.42), DIA (E.C.1.6.2.2.), PGM (E.C.2.7.5.1), MPI (E.C.5.3.1.8), FH (E.C.4.2.1.2), and GLUD (E.C.1.4.1.3). Thick starch gel electrophoresis was carried out, according to previous protocols (MILES *et al.*, 1980; MAAZOUN *et al.*, 1981; LE BLANCQ, 1983; MORENO *et al.*, 1986; ALVAR, 1988).

Karyotyping by pulse electrophoresis gradient (PFG)

The rotatory field electrophoresis, with curved electrodes, allows

the application of several pulse times in different directions of the electric field, improving the resolution of the separated DNA macromolecules (SOUTHERN *et al.*, 1987). The conditions were as follows: 42 h electrophoresis was carried out, using 125 v, pulse time from 100 to 20 sec., electric field angle from 120° to 95°, and 15°C temperature (GUTIÉRREZ-SOLAR, AGUIAR & ALVAR, 1990). The preparation of intact chromosomal DNA preparation has been previously described (VAN DER PLOEG *et al.*, 1984).

RESULTS

Isoenzyme analysis

The value 100 was arbitrarily taken for the electrophoretic mobility obtained for each enzymatic system of the LEM-75 strain. To obtain the enzymatic pattern and zymograph for all the stocks, every isolate was compared to the value of the LEM-75 strain. The results are summarized in Table 2 and Figures 1 and 2. Briefly, the LEM-307 and Daniel stocks showed a mobility of 105 for the isoenzyme G-6-PD and 140 for NP corresponding to ZM-29. The Oscar, 59933 and 5825 isolates showed a mobility of 105 for G-6-PD and 100 for NP corresponding to ZM-33. Such a result has been detected in Madrid pro-

vince for the first time. The ZM-28 LEM-458 marker shows a mobility of 102 for G-6-PD and of 140 for NP. The rest of the mobilities obtained with all isoenzymes used, for every stock, were 100, similar to LEM-75 ZM-1 (results not shown in the Figures).

Karyotyping by PFG/RFE

The pattern in every stock contains over twelve bands (Fig. 3). There is a DNA condensation with an apparent size of 2300 kbp, two close 900 kbp bands constant in all stocks and a highly variable band pattern between 900 to 300 kbp. In the Daniel stock a very low MW band of 150 kbp is visible. By densitometric comparison a clear homology can be established between the LEM-307 and Oscar strains, the latter showing two additional bands of 350 and 340 kbp.

DISCUSSION

The assertion that *L. infantum* is the only *Leishmania* species in Spain responsible for cutaneous leishmaniasis

Stock name	Code	Zymodeme	Host	Lesion	Origin
* LEM-75	MHOM/FR/80/LEM-75	ZM-1	HIV(-)	Visceral	Pirineos
* LEM-307	MHOM/ES/81/LEM-307	ZM-29	HIV(-)	Cutaneous	Barcelona
* LEM-458	MHOM/ES/83/LEM-458	ZM-28	HIV(-)	Visceral	Barcelona
Oscar	MHOM/ES/88/LLM-106	ZM-33	HIV(+)	Cutaneous	Madrid
Antonio	MHOM/ES/88/LLM-150	ZM-1	HIV(+)	Visceral	Madrid
Daniel	MHOM/ES/88/LLM-175	ZM-29	HIV(+)	Visceral	Madrid
59933	MHOM/ES/90/LLM-200	ZM-33	HIV(+)	Visceral	Madrid
58140	MHOM/ES/90/LLM-195	ZM-1	HIV(+)	Visceral	Madrid
Milagros	MHOM/ES/88/LLM-180	ZM-1	HIV(+)	Visceral	Madrid
Jesús	MHOM/ES/88/LLM-190	ZM-1	HIV(+)	Visceral	Madrid
5825	MHOM/ES/90/LLM-205	ZM-33	HIV(+)	Visceral	Madrid

Table 1.— Characteristics of the *Leishmania* stocks isolates from HIV seropositive persons. * = zymodeme *L. infantum* markers.

Stock	75	307	458	Osc.	Ant.	Dan.	Mil.	Jes.	58140	59933	5825
GPI	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
6PGD	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
NP1	100	140	140	100	100	140	100	100	100	105	100
NP2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
G6PD	100	105	102	105	100	105	100	100	100	105	105
GOT1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GOT2	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MDH	100	104	104	104	100	104	100	100	100	104	104
ME	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ICD	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
DIA	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
PGM	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
MPI	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
FH	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
GLUD	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
ZM	1	29	28	33	1	29	1	1	1	33	33

Table 2.— Isoenzyme profile of several *Leishmania infantum* stocks isolated from HIV seropositive persons.

was tested again in the Oscar cutaneous isolate, whose isoenzyme pattern corresponds with *L. infantum* ZM-33. This observation has been pinpointed previously using isoenzyme analysis in several Southwest European countries, including Spain (RIOUX *et al.*, 1980; PORTUS *et al.*, 1986; AIVAR & ORTIZ, 1987; AIVAR, 1988; PORTUS *et al.*, 1989).

ZM-29 has been isolated from *L. infantum* cutaneous stocks (PORTUS *et al.*, 1986), both in southeast France and Spain (Barcelona). In the present study this ZM-29 was found in a visceral isolate (Daniel) from Madrid (Ta-

ble 2). ZM-33 was previously described in France and recently detected in Barcelona (PORTUS *et al.*, 1989). Its presence in three additional stocks from Madrid is here corroborated: two from visceral lesions and one from a diffuse cutaneous leishmaniasis. A similar situation has been reported in Italy for a cutaneous zymodeme, ZM-24, isolated from bone marrow in an immunocompromised patient (GRADONI, GRAMICCIA & BERTINI, 1990). In the Alpes Maritimes region (France) a set of seven characterized visceral stocks from HIV seropositives were ZM-1 (MARTY *et al.*, 1989). The anergic condition of those pa-

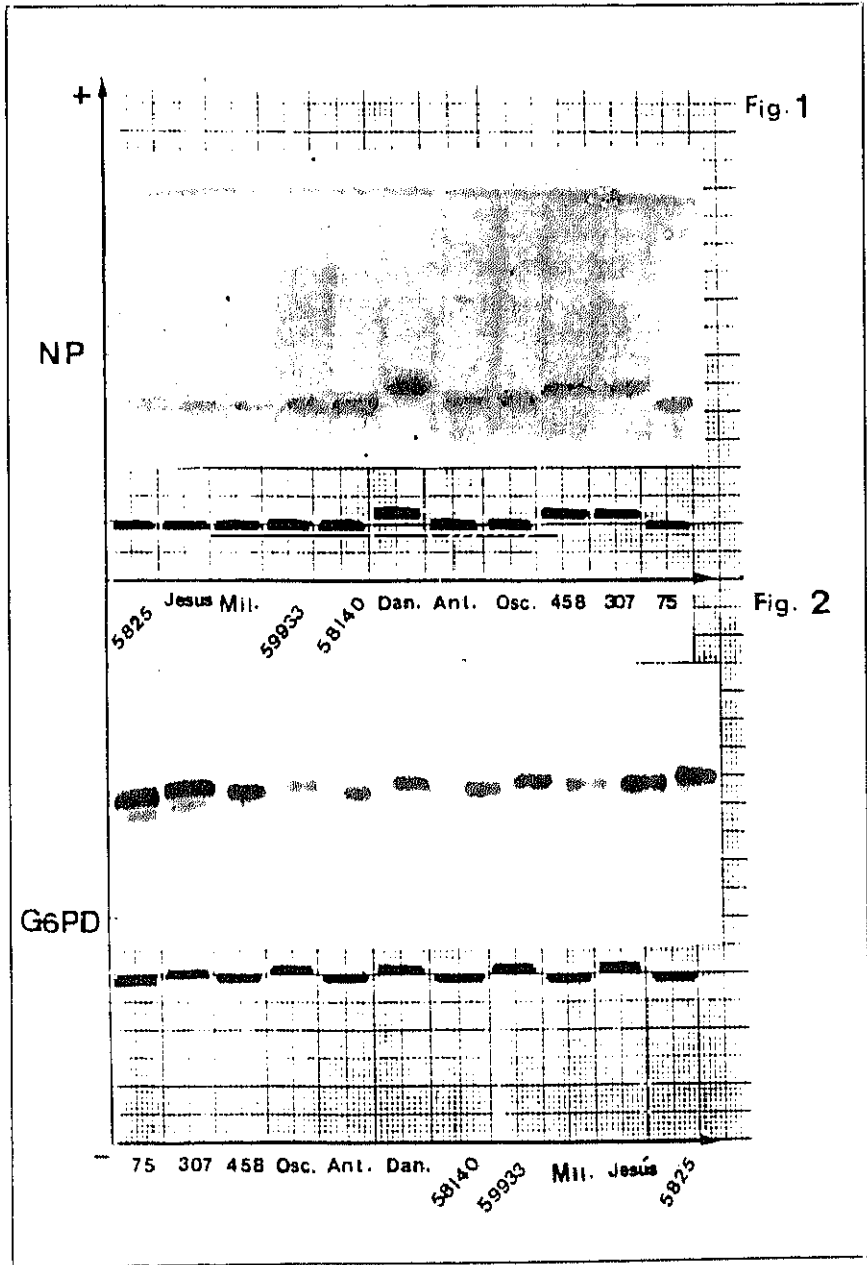


Fig. 1 and 2 — Electrophoretic pattern and zymograph of different *Leishmania* stocks isolated from HIV (+) persons: 1) obtained for the enzyme NP; 2) obtained for the enzyme G-6-PD

tients permits parasite dissemination both in the viscera as well as in the skin (YEBRA *et al.*, 1988). The opposite situation has been demonstrated for *L. tropica*, typically dermatropic, isolated from the spleen in patients with a deficient immunological condition in Ethiopia (SCHNUR *et al.*, 1981).

The high variability found with PFG has been previously proved using kDNA digestion and hybridization patterns for Spanish *L. infantum* stocks (AIVAR *et al.*, 1989b), and Italian samples (ANGELICI, GRAMICCIA & GRADONI, 1989). This fact makes the definition of epidemiological markers for the clinical development of the disease much more difficult. None of the methods used identified any specific characteristic for leishmaniasis/AIDS isolates. This fact suggests that in the leishmaniasis/AIDS association *Leishmania* is not unique. In a few words, the *Leishmania* stocks found in AIDS patients are the same as the parasites responsible for the pathology in the normal host, but the immunodepression amplifies the pathology of the disease both in number and in severity.

REFERENCES

- AIVAR (J.), 1988.— *Caracterización molecular de Leishmania infantum*. Aplicaciones a estudios clínicos y epidemiológicos. Tesis Doctoral, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, 250 pp.

- AIVAR (J.) & BLAZQUEZ (J.), 1986.— Leishmaniasis en procesos de inmunodeficiencia. Consideraciones sobre diez casos descritos procedentes de la Cuenca Mediterránea Occidental. *Anales de Medicina Interna* (Madrid), 3: 438-441.
- AIVAR (J.) & ORTIZ (M.), 1987.— Caracterización isoenzimática de cepas de *Leishmania* aisladas en la provincia de Madrid. *Revista Iberoica de Parasitología*, Vol. Extra: 45-50.
- AIVAR (J.), BLAZQUEZ (J.) & NAVIERA (R.), 1989a.— Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 160: 560-561.
- AIVAR (J.), MENDOZA (A.), BENITO (A.) & BARKER (D.C.), 1989b.— Characterization of Spanish *Leishmania* isolates with kinetoplast DNA probe. in: *EUROLEISH/EEC Congress (Ostende)*, Abstracts of Papers, Ostende: 11-16.
- ANGELICI (M.C.), GRAMICCIA (M.) & GRADONI (L.), 1989.— Study on genetic polymorphism of *Leishmania infantum* through the analysis of restriction enzyme digestion patterns of kinetoplast DNA. *Parasitology*, 99: 301-309.
- BADARO (R.), CARVALLO (E.M.), ROCHA (H.), QUEIROZ (A.C.) & JONES (T.C.), 1986.— *Leishmania donovani*: an opportunistic microbe associated with progressive disease in three immunocompromised patients. *Lancet*, 1986, i: 647-648.
- BERNGER (J.), MORENO (S.), CERENADO (E.), BERNALDO DE QUIROS (J.C.L.), GARCIA DE LA FUENTE (A.) & BOLZA (L.), 1989.— Visceral leishmaniasis in patients infected with human immu-

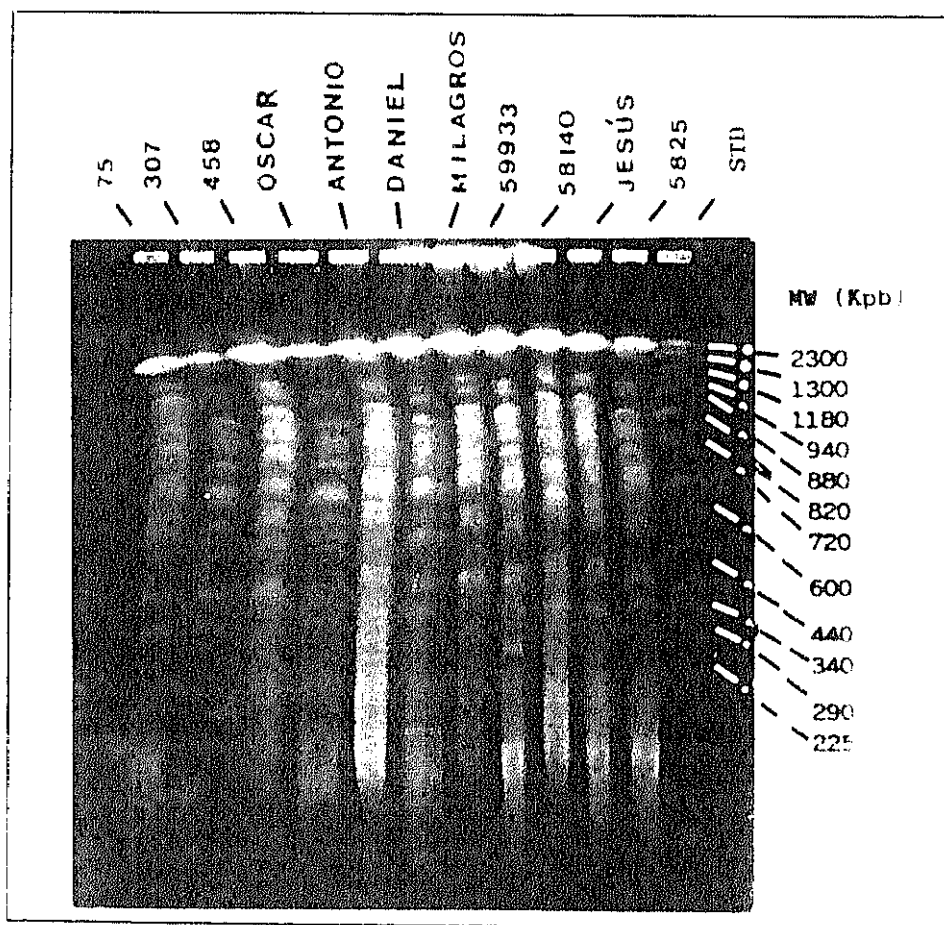


Fig. 3.— Karyotyping of *Leishmania infantum* stocks isolated from HIV positive patients.

- nodeficiency virus (HIV). *Annals of Internal Medicine*, 111: 129-132.
- BLANCO (S.M. LE), 1983.— *An epidemiological and taxonomic study of Old World Leishmania using isoenzymes*. Thesis, University of London, London, 252 pp.
- FERNANDEZ-GUERRERO (M.L.), AGUADO (J.M.), BUZÓN (L.), BARROS (C.), MONTALBÁN (C.), MARTÍN (T.) & BOUZA (E.), 1987.— Visceral leishmaniasis in immunocompromised hosts. *American Journal of Medicine*, 83: 1098-1102.
- GRADONI (L.), GRAMICCIA (M.) & BETTINI (F.), 1990.— Fatal visceral disease caused by a dermatropic *Leishmania* in a patient with human immunodeficiency virus infection. *Journal of Infection*, 20: 180-182.
- GUTIERREZ-SOLAR (B.), AGUIAR (A.) & ALVAR (J.), 1990.— Electroforesis por gradiente de pulsos (RFE) en la caracterización de *Leishmania infantum*. In: *IV Congreso de la SEIMC. (Madrid), Abstracts of Papers*, Madrid: E 4/14.
- LOMA (A. DE LA), ALVAR (J.), MARTÍNEZ-GALIANO (E.), BLÁZQUEZ (J.), ALCALA-MUÑOZ (A.) & NAJERA (R.), 1985.— Leishmaniasis or AIDS? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 79: 421-422.
- MAAZOUN (R.), LANOTTE (G.), PASTEUR (N.), RIOUX (J.A.), KENNOU (M.F.) & PRATLONG (F.), 1981.— Écologie des Leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution à l'analyse chimio-taxonomique des parasites de la leishmaniose viscérale méditerranéenne. A propos de 55 souches isolées en Cevennes, Côte d'Azur, Corse et Tunisie. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée*, 56: 131-146.
- MARTY (P.), PESCE (A.), FUZIBET (J.G.), BERNARD (E.), BERTRAND (F.), SAINT-PAUL (M.C.), GARI-TOUSSAINT (M.) & FICHOUX (Y. LE), 1989.— Aspects biocliniques de la leishmaniose viscérale chez les sidéens. *Bulletin de la Société Française de Parasitologie*, 7: 159-161.
- MILES (M.A.), LANHAM (S.M.), SOUZA (A.A. DE) & POVOA (M.), 1980.— Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74: 221-237.
- MONTALBÁN (C.), MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ (R.), CALLEJA (J.L.), GARCÍA-DÍAZ (J.), RUBIO (R.), DRONDA (F.), MORENO (S.), YEBRA (M.), BARROS (C.), COBO (J.), MARTÍNEZ (F.C.), RUIZ (F.) & COSTA (J.R.), 1989.— Visceral leishmaniasis (Kala-Azar) as an opportunistic infection in patients infected with the human immunodeficiency virus in Spain. *Reviews of Infectious Diseases*, 11: 655-660.
- MORENO (G.), RIOUX (J.A.), LANOTTE (G.), PRATLONG (F.) & SERRES (E.), 1986.— Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In: *Leishmania: taxonomie et phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques* (J.A. Rioux edit.), Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques, Montpellier: 433-438.
- PLOEG (L.H.T. VAN DER) SCHWARTZ (D.C.), CANTOR (C.R.) & BORST (P.), 1984.— Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* analyzed by electrophoretic separation of chromosome-size DNA molecules. *Cell*, 37: 77-84.
- PORTUS (M.), RIOUX (J.A.), GALLEGO (J.), LANOTTE (G.), PRATLONG (F.) & MORENO (G.), 1986.— Les leishmanioses en Catalogne (Espagne). A propos de l'identification enzymatique de neuf souches de origine humaine et canine. In: *Leishmania: taxonomie et phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques* (J.A. Rioux edit.), Institut Méditerranéen d'Etudes Epidémiologiques et Ecologiques, Montpellier: 433-438.
- PORTUS (M.), GALLEGO (J.), RIOUX (J.A.), PRATLONG (F.), MORENO (G.), FISA (R.), GALLEGO (M.), MUÑOZ (C.), RIERA (C.), SANCHEZ (F.) & SERRA (T.), 1989.— Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in Catalonia (Spain). *Revista Ibérica de Parasitología*, 49: 287-289.
- RIOUX (J.A.), LANOTTE (G.), MAAZOUN (R.), PERELLÓ (R.) & PRATLONG (F.), 1980.— *Leishmania infantum* Nicolle 1908 agent du bouton d'Orient autochtone. A propos de l'identification biochimique de deux souches isolées dans les Pyrénées-Orientales. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences, Paris*, 291: 701-703.
- SCHNUR (L.F.), CHANCE (M.L.), EBERT (F.), THOMAS (S.C.) & PETERS (W.), 1981.— The biochemical and serological of visceralizing *Leishmania*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 75: 131-144.
- SENALDI (G.), CADEO (G.), CARNEVALE (G.), PERRI (G. DI) & CAROSI (G.), 1986.— Visceral leishmaniasis as an opportunistic infection. *Lancet*, 1986, ii: 1094.
- SOUTHERN (E.M.), ANAD (R.), BROWN (W.R.A.) & FLETCHER (D.S.), 1987.— A model for the separation of large DNA molecules by crossed field gel electrophoresis. *Nucleic Acid Research*, 15: 5925-5943.
- World Health Organization, 1991.— AIDS, leishmaniasis, dangers of dash highlighted. *TDR News*, 36: 1.
- YEBRA (M.), SEGOVIA (J.), MANZANO (L.), VARGAS (J.A.), BERNALDO DE QUIROS (L.) & ALVAR (J.), 1988.— Disseminated to skin kala-azar and the acquired immunodeficiency syndrome. *Annals of Internal Medicine*, 108: 490-491.

- Rees, P. H., Kager, P. A., Keating, M. I. & Hockmeyer, W. T. (1980). Renal clearance of pentavalent antimony (sodium stibogluconate). *Lancet*, ii, 226.
- Tahkur, C. P. & Sinha, P. K. (1989). Inefficacy of ethambutol, ethambutol plus isoniazid, INH and rifampicin, co-trimoxazole and metronidazole in the treatment of kala-azar. *Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 92, 383.
- Veiga, J. P. R., Wolff, E. F., Sampaio, R. N. & Marsden, P. D. (1983). Renal tubular dysfunction in patients with muco-

cutaneous leishmaniasis treated with pentavalent antimonials. *Lancet*, ii, 569.

WHO (1984). *The Leishmaniasis*. Geneva: World Health Organization, Technical Report Series, no. 710, pp. 100-103.

Received 9 October 1991; revised 9 January 1992; accepted for publication 15 January 1992

Short Report

Isolation of *Leishmania infantum* from the blood of a patient with AIDS using sandflies.

R. Molina¹, R. López-Vélez², B. Gutiérrez-Solar¹, M. I. Jiménez¹ and J. Alvar¹. ¹Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid, Spain; ²Unidad de Medicina Tropical y Parasitología Clínica, Servicio de Microbiología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid, Spain

Leishmaniasis associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection is being increasingly reported in Mediterranean countries, mainly Spain (ALTES *et al.*, 1991; BERENGUER *et al.*, 1989; MONTALBÁN *et al.*, 1989; PETERS *et al.*, 1990). Over 30% of the patients do not exhibit any specific anti-*Leishmania* antibodies despite the fact that parasites are present in bone marrow aspirates (ALVAR *et al.*, 1989). *Leishmania infantum* is usually scarce in the samples, making its demonstration by Giemsa staining difficult.

Therefore, alternative techniques, such as cultivation or the polymerase chain reaction (PCR), are being developed as methods to amplify the organisms. However, the peculiar clinical status of some patients presents difficulties in obtaining an adequate sample for diagnosis.

Here we report a patient suffering from acquired immune deficiency syndrome (AIDS) and anti-*Leishmania* antibodies at a titre of 1:64 by indirect fluorescent antibody testing. Treatment was immediately started with pentavalent antimonials. The low level of specific antibodies prompted an attempt to demonstrate the presence of amastigotes. Bone marrow aspiration and blood sampling were attempted 2 d after the beginning of treatment, but the former was impossible due to the clinical condition of the patient. Only 3 ml of blood were obtained: 1.5 ml was unsuccessfully used in an attempt to separate the buffy coat in a Ficoll³ gradient for the PCR. Fifty-three female *Phlebotomus perniciosus*, from a sandfly colony established in our laboratory with specimens collected in Spain (MOLINA, 1991), were artificially fed on the remaining 1.5 ml of blood using a membrane feeding apparatus with the skin of a 3 d old chicken as membrane (WARD *et al.*, 1978). Thirty-five sandflies were dissected 7 d after feeding and 9 were infected with *Leishmania* (25.7%). The *Leishmania* stock was isolated in NNN medium and characterized by the analysis of 15 enzymes as *L. infantum* zymodeme 33.

The blood was handled according to the recommendations of the Centers for Disease Control, USA (CDC, 1988), and the membrane feeding procedure was carried out in a sealed room with double doors. The holding cage with the fed flies was kept in a chamber made of transparent plastic material and the unfed flies were removed with a mechanical aspirator and immediately killed.

We suggest this simple xenodiagnostic method as an alternative means of demonstrating *Leishmania* in specialized laboratories when the usual techniques have failed and the suspicion of leishmaniasis is strong.

Additionally, we emphasize the ease with which *P. perniciosus* was experimentally infected. This suggests, from the epidemiological point of view, that some immunodepressed patients suffering from leishmaniasis could serve as reservoirs of this parasitic disease.

References

- Altes, J., Salas, A., Riera, M., Udina, M., Galmés, A., Balanzat, J., Ballesteros, A., Buades, J., Salvá, F. & Villalonga, C. (1991). Visceral leishmaniasis: another HIV associated opportunistic infection? Report of eight cases and review of the literature. *AIDS*, 5, 201-207.
- Alvar, J., Blázquez, J. & Nájera, R. (1989). Association of visceral leishmaniasis and human immunodeficiency virus infections. *Journal of Infectious Diseases*, 160, 560-561.
- Berenguer, J., Moreno, S., Cercenado, E., Bernaldo de Quirós, J. C. L., García de la Fuente, A. & Bouza, E. (1989). Visceral leishmaniasis in patients infected with human immunodeficiency virus (HIV). *Annals of Internal Medicine*, 111, 129-132.
- CDC (1988). Update: universal precautions for prevention of transmission of human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, and other blood borne pathogens in health-care settings. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 37, 377-387.
- Molina, R. (1991). Laboratory adaptation of an autochthonous colony of *Phlebotomus perniciosus* Newstead, 1911 (Diptera: Psychodidae). *Research and Reviews in Parasitology*, 51, 55-57.
- Montalbán, C., Martínez-Fernández, R., Calleja, J. L., García-Díaz, J. D., Rubio, R., Dronda, F., Moreno, S., Yebra, M., Barros, C., Cobo, J., Martínez, M. C., Ruiz, F. & Costa, J. R. (1989). Visceral leishmaniasis (kala-azar) as an opportunistic infection in patients with the human immunodeficiency virus in Spain. *Reviews of Infectious Diseases*, 11, 655-660.
- Peters, B. S., Fish, D., Golden, R., Evans, D. A., Bryceson, A. D. M. & Pinching, A. J. (1990). Visceral leishmaniasis in HIV infection and AIDS: clinical features and response to therapy. *Quarterly Journal of Medicine*, 283, 1101-1111.
- Ward, R. D., Lainson, R. & Shaw, J. J. (1978). Some methods for membrane feeding of laboratory reared neotropical sandflies (Diptera: Psychodidae). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 72, 269-276.

Received 26 February 1992; revised 14 April 1992; accepted for publication 15 April 1992

VISCERAL LEISHMANIASIS IN ANGOLA DUE TO *LEISHMANIA (LEISHMANIA) INFANTUM*

MARIBEL JIMENEZ, SABINO PUENTE, BEATRIZ GUTIERREZ-SOLAR,
PILAR MARTINEZ, AND JORGE ALVAR

Laboratorio Nacional de Referencia de Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional
de Microbiología, and Centro Nacional de Investigaciones Clínicas y Medicina Preventiva,
Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain

Abstract. A 26-year-old man from Angola with no history of travel outside the country presented with typical symptoms of visceral leishmaniasis. The parasite was isolated and biochemically characterized using both kinetoplast DNA and nuclear DNA probes and showed a strong homology with *Leishmania (Leishmania) donovani sensu lato (s.l.)*. When the nuclear DNA of the isolate was hybridized with a specific *Leishmania (L.) infantum* probe, the pattern obtained showed a clear signal with this species. To establish its identity more specifically, this isolate was typed using a 15-system isoenzyme panel and thick-starch gel electrophoresis, and was identified as *L. (L.) infantum* zymodeme 1 (MAD-1), the most widespread zymodeme in Mediterranean countries. One case of visceral leishmaniasis has been reported in Angola, but this case is the first report of *L. (L.) infantum* in Africa south of the equator.

The two *Leishmania* species responsible for visceral leishmaniasis (VL) are included in the *Leishmania (Leishmania) donovani s.l.* group.¹ These are *L. (L.) donovani sensu strictu (s.s.)* in India and east Africa, and *L. (L.) infantum* in countries bordering the Mediterranean Sea and China. *Leishmania (L.) chagasi* in the Americas is considered by most investigators to be *L. (L.) infantum* and *L. (L.) archibaldi* in east Africa is considered to be a variant of *L. (L.) donovani s.s.* There is little information available on VL in African countries south of the equator, and only few reports of its sporadic presence are known.²

Leishmania typing is basically performed by isoenzyme analysis and DNA probing, but both methods have advantages and disadvantages. Isoenzyme characterization is a phenotypic method that requires 5×10^5 promastigotes for each assay. Some isolates are difficult to culture; thus, preparation of enough material for 15 isoenzyme systems is expensive and time-consuming. DNA typing circumvents this limitation and gives quantitative and qualitative genotypic information. However, the most accurate information for correlating virulence and pathogenesis is obtained by isoenzyme analysis, with *L. (L.) infantum* being a good example in which cutaneous and visceral zymodemes have been described. Among many published zymodemes for this species, zymodeme 1 (synonymous with

MON-1, LON-49, and MAD-1) is most widespread as a cause of VL in humans, dogs, foxes, and rats in the Mediterranean basin.¹

MATERIALS AND METHODS

Case report. A 26-year-old man from Angola came to Spain three weeks prior to medical consultation for fever (40°C), weight loss, and frequent epistaxis. For one month, he had had abdominal pain and fever. He was found to have a 4-cm hepatomegaly and a 22-cm splenomegaly that reached the right iliac crest. A pancytopenia was noted with other laboratory test results compatible with leishmaniasis: 1,600 leukocytes/mm³, hemoglobin (75 g/L), hematocrit (22.5%), 162,000 platelets/mm³, total proteins (1,080 g/L), albumin (25 g/L), alfa-1 globulin (2 g/L), alfa-2 globulin (5 g/L), beta globulin (9 g/L), gamma-globulin (67 g/L), and polyclonal IgG (81.94 g/L). Tests results for hepatitis B and C virus, *Salmonella*, brucellosis, rickettsia, active malaria, and schistosomiasis were negative. Antibodies to human immunodeficiency virus were not detected by enzyme-linked immunosorbent assay and Western blotting. A bone marrow aspirate showed frequent amastigotes. Serologic analysis for leishmaniasis by an immunofluorescent antibody test showed a titer of 1/640 and counter immunoelectrophoresis showed specific precipitation arcs.

The patient was treated with 20 mg/kg/day of

meeglumine antimoniate for 21 days and showed total recovery within a few weeks. No relapses were observed during the next seven months. He showed a weight gain of 10 kg and a reduction in splenomegaly from 22 cm to 2 cm. Other laboratory test results were as follows: hemoglobin (127 g/L), hematocrit (38.88%), total proteins (94 g/L), albumin (52.1 g/L), alpha-1 globulin (2.2 g/L), alpha-2 globulin (8.1 g/L), beta globulin (7.7 g/L), gamma-globulin (24 g/L), polyclonal IgG (23.80 g/L).

Biochemical characterization. The stock was isolated by bone marrow aspiration, grown in NNN medium, and cultured on a large scale in RPMI 1640 medium supplemented with 10% fetal calf serum (FCS). The code name given to this strain was MHOM/AO/91/LLM-85 (Paulo) *L. (L.) infantum*. The following international reference markers of *Leishmania* species and *L. (L.) infantum* zymodemes were used: MHOM/ET/72/L-100 (LRC-L 147) *L. (L.) aethiopica*, MHOM/IQ/65/A. SINAI 1 (LRC-L 32) *L. (L.) tropica*, MHOM/SU/74/K27 *L. (L.) tropica*, MHOM/SU/73/5-ASKH *L. (L.) major*, MHOM/ET/67/HU3 (LRC-L 133) *L. (L.) donovani s.s.*, MHOM/TN/80/IPT-1 *L. (L.) infantum*, MHOM/FR/78/LEM-75 *L. (L.) infantum* reference strain for zymodeme 1 (MON-1), MHOM/ES/81/LEM-307 *L. (L.) infantum* reference strain for zymodeme 29 (MON-29), MHOM/DZ/83/LEM-425 *L. (L.) infantum* reference strain for zymodeme 80, and MHOM/FR/82/LEM-356 *L. (L.) infantum* reference strain for zymodeme 33 (MON-33).

Protocols for isolating *Leishmania* DNA have been previously described.⁴ Briefly, kDNA and nDNA were purified in by cesium chloride-ethidium bromide density gradient centrifugation. The kDNAs were digested with *Hae* III and the fragments were separated by electrophoresis on 1.8% agarose gels. After the nDNAs were digested with *Pst* I and *Hind* III/*Bam* HI, they were subjected to electrophoresis on 0.7% agarose gels and Southern-blotted onto nylon membranes.⁵ Kinetoplast DNA hybridization was carried out using an *L. (L.) donovani s.l.*-specific kDNA probe (400 basepairs) designated 307/k-1 (Alvar J, unpublished data). Nuclear DNA hybridization was performed with the 7-059 nDNA probe prepared from an *L. infantum* cDNA library that is also specific for *L. (L.) donovani s.l.*⁶ An additional hybridization was done using nDNA of the isolate and probe pDK20 selected

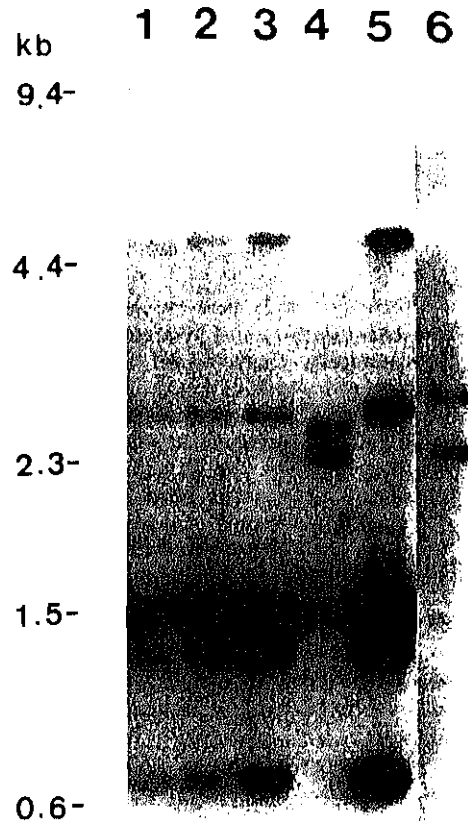


FIGURE 1. Autoradiograph of a Southern blot of leishmanial nuclear DNAs digested with *Pst* I and hybridized with the 7-059 probe. Lane 1 = IPT-1; lane 2 = Paulo; lane 3 = LEM-75; lane 4 = 5-ASKH; lane 5 = LRC-133; lane 6 = LRC-32. kb = kilobases.

from a genomic library of *L. major* (MHOM/SN/00/DK1) that can distinguish between *L. (L.) donovani s.s.* and *L. (L.) infantum*.⁷ Probes were labeled with ³²P by the random primer method. Results were obtained by autoradiography.

Isoenzyme typing was carried out with 5 × 10⁸ promastigotes that were harvested from RPMI 1640-10% FCS by centrifugation and washed three times. Thick starch gel electrophoresis was performed following previous protocols using a 15-enzyme system panel:^{8,9} glucose phosphate isomerase (GPI EC.5.3.1.9), 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD

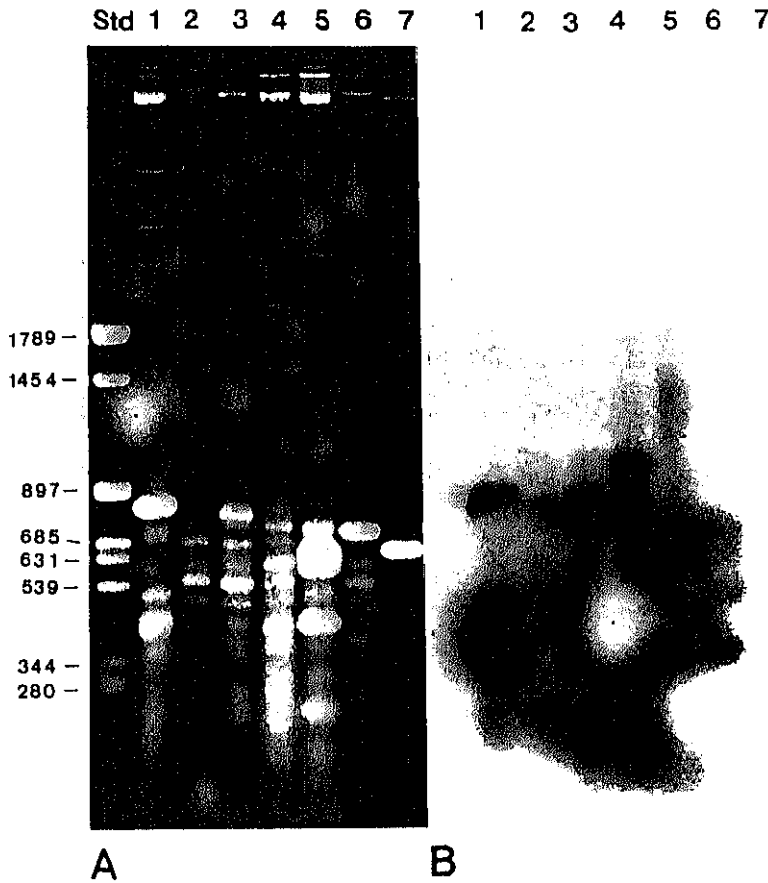


FIGURE 2. A, banding patterns of leishmanial kinetoplast DNAs digested with *Hae* III. Lane Std = phage PM2 digested with *Hae* III; lane 1 = LEM-307; lane 2 = 5-ASKH; lane 3 = IPT-1; lane 4 = Paulo; lane 5 = LEM-75; lane 6 = LRC-133; lane 7 = LRC-32. B, autoradiograph of the gel in A blotted on a nylon membrane and hybridized with the 307/k-1 DNA probe. Values on the left side of A are in basepairs.

EC.1.1.1.44), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD EC.1.1.1.49), nucleosyl phosphorylase 1 (NP-1 EC.2.4.2), nucleosyl phosphorylase 2 (NP-2 EC.2.4.2), glutamate oxaloacetate transferase 1 and 2 (GOT-1 and GOT-2 EC.2.6.1.1), malic enzyme (ME EC.1.1.1.40), malate dehydrogenase (MDH EC.1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase (ICD EC.1.1.1.42), phosphoglucumutase (PGM EC.2.7.5.1), diaphorase (DIA EC.1.6.2.2), mannose phosphate isomerase (MPI EC.5.3.1.8), glutamate dehydrogenase (GLUD EC.1.4.1.3), and fumarate hydratase (FH EC.4.2.1.2). The data were analyzed with the numerical taxonomy program TAXAN (Information Resources Group, Maryland Biotechnology Institute, University of Maryland, College Park, MD) and by applying the Jaccard's

similarity index $S(J)$. A similarity matrix was computed and transformed into an agglomerative hierarchical cluster and relationships were depicted in a dendrogram.

RESULTS

Characterization of nDNA of the Paulo strain by Southern blotting followed by hybridization with the 7-059 cDNA probe showed the same banding pattern as the markers for *L. donovani* s.l. (*L. (L.) infantum* (IPT-1, LEM-75) and *L. (L.) donovani* s.s. (LRC-L 133)), but a pattern that was different from those of *L. (L.) major* (5-ASKH) or *L. (L.) tropica* (LRC-L 32). The observed bands of 6.3, 3.0, 1.6, 1.4, and 0.8 kb

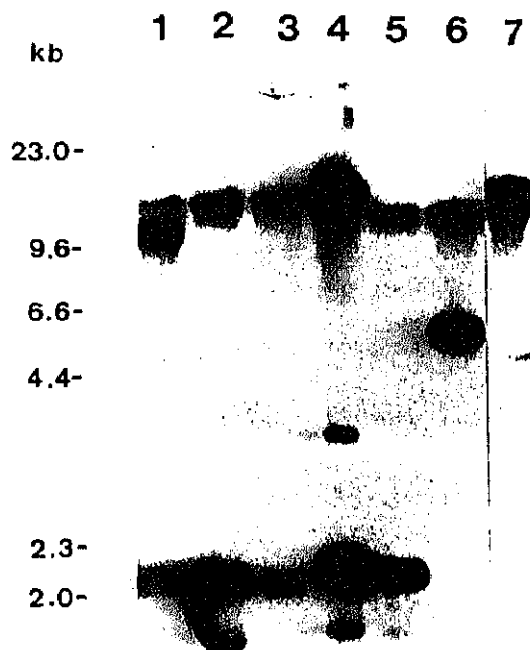


FIGURE 3. Southern blot of nuclear DNAs digested with *Hind* III and *Bam* HI and hybridized with the pDK20 probe. Lane 1 = LEM-425; lane 2 = LEM-75; lane 3 = IPT-1; lane 4 = Paulo; lane 5 = LRC-133; lane 6 = 5-ASKH; lane 7 = LRC-32. kb = kilobases.

have been shown to be specific for the *Leishmania* species that cause VL (Figure 1).

When the kDNA of the Paulo strain was characterized with the 307/k-1 kDNA probe, a clear hybridization signal was obtained, similar to the one given by other *L. (L.) infantum* markers (LEM-307, IPT-1, and LEM-75) and *L. (L.) donovani* s.s. (LRC-L 133). This confirmed the relationship of the Paulo strain with *L. (L.) donovani* s.l. No cross-hybridization was observed with *L. (L.) tropica* (LRC-L 32). The fragment used as probe is present in different minicircle families and shows a significantly higher number of copies for the homologous stock LEM-307 (Figure 2).

The pattern obtained with the nDNA of the Paulo strain hybridized with the pDK20 probe is closely related to *L. (L.) infantum* (LEM-75 and IPT-1) rather than to *L. (L.) donovani* (LRC-L 133). The 18-kb fragment in *L. (L.) infantum* stocks seems to be analogous to the 14-kb fragment in *L. (L.) donovani*, in which an additional hybridizing 4-kb fragment is present (Figure 3).

The enzymatic pattern and zymograph for all strains and stocks was obtained by comparison of the electrophoretic mobility of each enzyme with the enzyme mobilities of strain LEM-75, using 100 as an arbitrary standard value. The mobility patterns of the GOT-1 and MDH isoenzymes differentiated *L. (L.) donovani* s.s. and *L. (L.) infantum*, and the patterns obtained with

TABLE 1
Isoenzyme profile of *Leishmania* Old World reference strains, *L. (L.) infantum* reference strains, and the Angola stock obtained by comparison of the electrophoretic mobility of each enzyme with the enzyme mobilities of the reference strain LEM-75*

Reference strains	Enzyme															
	ICD	G6PD	NP1	NP2	MDH	ME	PGD	MP1	GPI	GOT-1	GOT-2	GLUD	FH	DIA	PGM	ZM
LEM-75†	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
LEM-307†	100	105	140	100	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	29
LEM-356†	100	105	100	100	104	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	33
IPT-1	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1
5-ASKH	90	94	400	90	160	88	122	150	77	110	110	200	79	100	118	4
LRC-147	100	82	700	120	130	108	140	105	53	127	110	100	105	100	123	14
K-27	100	82	450	100	112	100	93	100	76	135	90	95	100	100	108	60
LRC-32	100	82	450	90	100	95	95	101	76	135	90	95	100	100	100	39
LRC-133	100	100	140	100	112	100	100	100	100	113	113	100	100	100	100	18
Angola stock																
Paulo	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	1

* For definition of enzymes, see Materials and Methods. Values are relative mobilities, using 100 as an arbitrary standard. ZM = zymodeme.

† *L. (L.) infantum* zymodeme markers.

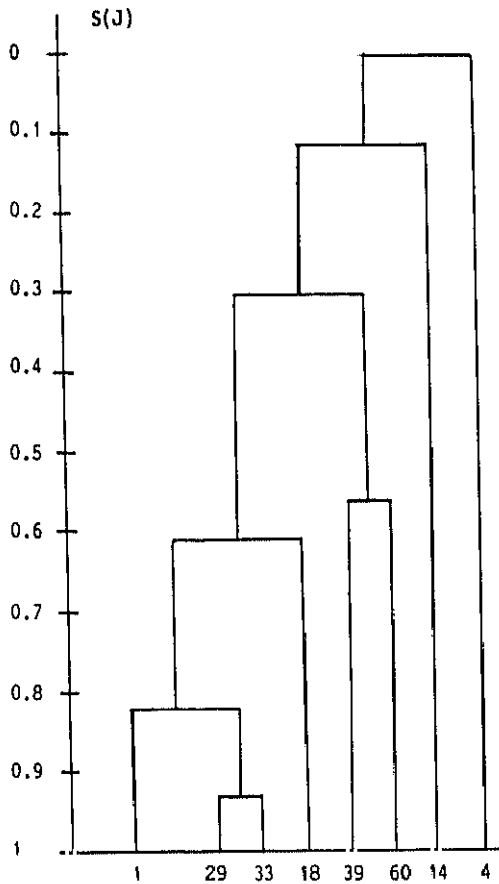


FIGURE 4. Dendrogram resulting from weighted average linkage cluster analysis applying the Jaccard's similarity index $S(J)$. Zymodeme (ZM)-1 = LEM-75 (*Leishmania infantum*), IPT-1, and Paulo; ZM-29 = LEM-307 (*L. infantum*); ZM-33 = LEM-356 (*L. infantum*); ZM-18 = LRC-133 (*L. donovani*); ZM-39 = LRC-32 (*L. tropica*); ZM-60 = K-27 (*L. tropica*); ZM-14 = LRC-147 (*L. aethiopica*); ZM-4 = 5-ASKH (*L. major*); IPT-1 (*L. infantum*), Paulo (*L. infantum*).

G6PD, NPI, and MDH identified the Paulo strain as *L. (L.) infantum* zymodeme MAD-1 (Madrid-1). The enzymatic profile is shown in Table 1. The dendrogram resulting from weighted average linkage cluster analysis is shown in Figure 4, in which the similarity between the Paulo, IPT-1, and LEM-75 strains can be observed.

DISCUSSION

The clinical history of the patient with splenomegaly and who had been in Spain for only

three weeks, with no history of travel to other countries, rules out the possibility that this infection was contracted outside Angola. Our patient was not an immigrant to Angola from nearby countries such as Zaire or Namibia, in which travel is restricted. One case of VL from Angola has been reported, but no information exists on this case (unpublished data). A few cases of VL have been reported in countries bordering Angola. In Zaire, one case of VL was reported in 1978 and six cases of cutaneous leishmaniasis (CL) were reported between 1983 and 1988. Two cases of VL were diagnosed in Zambia in the 1970s, but no known cases exist in the Congo. In Namibia, only 24 cases of CL caused by *L. (L.) tropica* are known. None of the above cited *Leishmania* stocks that cause VL have been characterized previously.²

In the Old World, species other than *L. (L.) donovani* s.l. are responsible for VL in exceptional situations, mainly in cases with immunodepression. *Leishmania (L.) tropica* has been reported as a visceralizing species in Sudanese patients.⁹ On the other hand, anomalous mucocutaneous leishmaniasis has been reported to be caused by *L. (L.) infantum* and *L. (L.) major*.^{10, 11} The dermatropic or viscerotropic zymodemes within the species *L. (L.) infantum* change their tissue trophism due to anergy when the patients are coinfecting with VL and acquired immunodeficiency syndrome.¹²⁻¹⁵ However, our patient was not immunodepressed.

The nDNA probe 0-759 has been shown to be a powerful tool in qualitatively differentiating all Old World *Leishmania* species, including *L. (L.) donovani* s.l., but not between *L. (L.) donovani* s.s. and *L. (L.) infantum*.⁶ The kDNA probe 307/k-1 is also not able to distinguish these species. However, the strong hybridization of the Paulo stock with these probes is consistent with its identification as a member of the *L. (L.) donovani* s.l. group. The probe pDK20 circumvents this limitation because it can distinguish between *L. (L.) donovani* s.s. and *L. (L.) infantum* on the basis of a nonconserved DNA sequence. This probe was tested with 50 reference stocks and showed no variation in its ability to distinguish between both species.⁷ This probe has also been useful in characterizing the Paulo stock as *L. (L.) infantum*.

Isoenzyme typing clearly showed that the Paulo stock could be assigned to the *L. (L.) infantum* zymodeme MAD-1. Zymodeme 1 is

widely disseminated as the causative agent of VL in countries bordering the Mediterranean Sea, as well as Portugal.¹⁵ The case of VL described here could be the result of an introduced focus from Portugal caused by population migration during the colonial period (16th and 17th centuries). It has also been suggested that *L. (L.) chagasi* was introduced into the Americas by the dogs of the Conquistadores.¹⁶ Conversely, we believe that *L. (L.) infantum* is disseminated in Africa and is established, not only in east Africa where its presence is well known, but also outside this area, in countries such as Senegal, the Central African Republic, or further to the south, in Angola.^{3, 17}

Acknowledgment: We thank Dr. G. J. J. M. van Eys for providing the cDNA probe 7-059 and pDK20.

Financial support: This study was supported by the Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social (Expte. 90/1172 BAE).

Authors' addresses: Maribel Jimenez, Beatriz Gutierrez-Solar, and Jorge Alvar, Servicio de Parasitologia, Centro Nacional de Microbiologia, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain. Sabino Puente and Pilar Martinez, Centro Nacional de Investigaciones Clinicas y Medicina Preventiva, Instituto de Salud Carlos III, 28029 Madrid, Spain.

Reprint requests: Jorge Alvar, Servicio de Parasitologia, Centro Nacional de Microbiologia, Instituto de Salud Carlos III, 28020 Majadahonda, Madrid, Spain.

REFERENCES

1. World Health Organization, 1990. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser* 793.
2. Desjeux P, 1991. *Information on the Epidemiology and Control of the Leishmaniasis by Country or Territory*. Geneva: World Health Organization, WHO/LEISH/91.30.
3. Moreno G, Rioux JA, Lanotte G, Pratlong F, Serres E, 1986. Le complexe *Leishmania donovani* s.l.—Analyse enzymatique et traitement numerique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogeographiques et phyletiques. Rioux JA, ed. *Leishmania: Taxonomie et Phylogenese*. Montpellier: IMEEE, 105–117.
4. Barker DC, Butcher J, Gibson LJ, Williams RH, 1986. *Characterization of Leishmania sp. by DNA Hybridization Probes. A Laboratory Manual*. Geneva: UNDP/WORLD BANK/WHO.
5. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
6. Van Eys GJ, Schoone GJ, Ligthart GS, Alvar J, Evans DA, Terpstra WJ, 1989. Identification of "Old World" *Leishmania* by DNA recombinant probes. *Mol Biochem Parasitol* 34: 53–62.
7. Van Eys GJ, Guizani I, Ligthart GS, Dellagi K, 1991. A nuclear probe for the identification of strains within the *Leishmania donovani* complex. *Exp Parasitol* 72: 459–463.
8. Maazoun R, Lanotte G, Pasteur N, Rioux JA, Kennou MF, Pratlong F, 1981. Ecologie des leishmanioses dans le sud de la France. 16. Contribution a l'analyse chimiotaxonomique des parasites de la leishmaniose viscerale mediterraneenne. A propos de 55 souches isolees en Cevennes, Cote d'Azur, Corse et Tunisie. *Ann Parasitol Hum Comp* 56: 131–146.
9. Schnur LF, Chance ML, Ebert F, Thomas SC, Peters W, 1981. The biochemical and serological taxonomy of visceralizing *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 75: 131–144.
10. Alvar J, Ballesteros A, Soler R, Benito A, van Eys GJJM, Schoone GJ, Cabrer B, 1990. Mucocutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (L.) infantum*: biochemical characterization. *Am J Trop Med Hyg* 43: 614–618.
11. Ghalib HW, Eltoum EA, Kroon CCM, El Hassan AM, 1992. Identification of *Leishmania* from mucosal leishmaniasis by recombinant DNA probes. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 158–160.
12. Jimenez MI, Gutierrez-Solar B, Benito A, Aguiar A, Garcia, Cercenado E, Alvar J, 1991. Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Res Rev Parasitol* 51: 91–94.
13. Marty P, Pesce A, Fuzibey JG, Bernard E, Bertrand F, Saint-Paul MC, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Ymichou Y, Giordana D, Brugnetti A, 1989. Aspects biocliniques de la leishmaniose viscerale chez les sideens. A propos de 7 observations au C.H.U. de Nice. *Bull Soc France Parasitol* 7: 159–161.
14. Graniccia M, Gradoni L, Troiani M, 1992. HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86: 161–163.
15. Abranches P, Conceicao-Silva FM, Silva-Pereira MCD, 1986. La leishmaniose viscerale dans la region de Lisbonne. Identification enzymatique. Interpretation structurale du foyer. Rioux JA, ed. *Leishmania: Taxonomie et Phylogenese*. Montpellier: IMEEE: 427–432.
16. Killick-Kendrick R, Molyneux DH, Rioux JA, Lanotte G, Leaney AJ, 1980. Possible origins of *Leishmania chagasi*. *Ann Trop Med Parasitol* 74: 563–565.
17. Desjeux P, Bray RS, Dedet JP, Chance ML, 1981. Differentiation of canine and cutaneous leishmaniasis strains in Senegal. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 76: 132–133.

Could infected drug-users be potential *Leishmania infantum* reservoirs?

Intravenous drug users (IVDU) represent over 65% of all HIV-positive cases in Spain. In a previous paper on the prevalence of leishmaniasis among AIDS patients, we suggested that syringes might be a transmission route for the parasite [1]. *Leishmania infantum* is the causative agent of both cutaneous and visceral forms of leishmaniasis in south-west European countries due to biochemical variants or zymodemes. In these countries, over 300 *L. infantum* isolates have been typed to date and only 12 zymodemes have been found. Zymodeme 1 is the variant found in immunocompetent humans in 90% of sicerotropic cases and, with a single exception, the only one detected in canines (the principal reservoirs of *L. infantum*). Zymodemes 24, 29 and 33 have been isolated from most immunocompetent cases of cutaneous leishmaniasis whose reservoirs are still not fully understood. However, these cutaneous zymodemes have also been isolated from bone marrow in AIDS patients, and are probably the expression of AIDS-associated anergy [2,3]. The clinical manifestation of leishmaniasis caused by *L. infantum* may thus be the result of a balance between the virulence of the parasite (zymodemes) and the efficiency of the cellular immune response. We typed 47 *L. infantum* viscerotropic isolates from HIV co-infected IVDU from Spain, seven of whom were asymptomatic.

Surprisingly, eight different zymodemes were found by starch gel electrophoresis using the current panel of 15 enzymes established by the Laboratoire d'Ecologie Médicale, Montpellier, France. Zymodeme 1 (MAD-1) was present in only 18 out of 47 isolates from Madrid (15 stocks) and Mallorca (3 stocks). Two new zymodemes, MAD-500 and MAD-501, were detected: MAD-500 was found in stocks from Andalucía (2) and Madrid (1) and MAD-501 in stocks from Madrid (2). Other common zymodemes were MAD-33 (7) and MAD-24 (9), both in Madrid stocks (the latter the first in Spain). MAD-27 (1), MAD-29 (3) and MAD-34 (4), were found mainly in Levante (the latter the first in Spain). Data on the enzymatic patterns were analysed using the TAXAN program for numerical taxonomy (Maryland Biotechnology Institute, College Park, Maryland, USA) in which Jaccard's similarity index is used. The variability demonstrated was much higher than that obtained in stocks from immunocompetent patients.

The consistent presence of certain zymodemes isolated from HIV-infected subjects that are uncommon in immunocompetent patients in Spain and absent in dogs, and the variability of *L. infantum* in co-infections reinforced with new zymodemes, suggest that co-infected patients are potential reservoirs for the above zymodemes and allow their transmission within IVDU communities. Syringes could act as the vehicles for parasite-infected circulating macrophages since, in co-infected patients, *Leishmania* is easily identified in blood by smear staining or isolated by xenodiagnosis using sandflies that ingest 0.5 µl in each setting (much less than the blood shared in syringes) [4,5].

Acknowledgement

Special thanks to Dr N. Saravia, Colombia for her fruitful comments.

J. Alvar and M. Jiménez, Laboratorio de Referencia de Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, 28220 Majadahonda, Madrid, Spain.

Sponsorship

Supported by a grant from the Avicenne/EEC Program (AVI*-CT92-0013).

Date of receipt: 1 March 1994; accepted: 7 March 1994.

References

1. Alvar J, Gutierrez-Solar B, Molina R, et al.: Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients [letter]. *Lancet* 1992, 239:1427.
2. Jimenez MI, Gutierrez-Solar B, Benito A, et al.: Cutaneous *Leishmania infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Rev Rev Parasitol* 1991, 51:95-99.
3. Grimaldi M, Gradoni L, Troun M: HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1992, 86:161-163.
4. Martinez P, de la Vega E, Laguna F, et al.: Diagnosis of visceral leishmaniasis in HIV-infected individuals using peripheral blood smears. *AIDS* 1993, 7:227-230.
5. Molina R, Cañavate C, Cercenado E, Laguna F, López-Vélez R, Alvar J: Indirect xenodiagnosis of visceral leishmaniasis in 10 HIV-infected patients using colonized *Phlebotomus perniciosus* [letter]. *AIDS* 1994, 8:277-279.

Sexually transmitted diseases in rural Africa

There are many reasons why sexually transmitted diseases (STD) are a major problem in rural Africa. Much of the focus now is on the combined effect of a deficient infrastructure with inadequate training and poor motivation among the government staff

who have to treat drug-resistant organisms with a restricted supply of drugs. The implication of this assessment is that a massive investment in the health infrastructure will have a major impact on STD in rural Africa and, by implication, on the spread of

Short Report

New *Leishmania (Leishmania) infantum* zymodemes responsible for visceral leishmaniasis in patients co-infected with HIV in Spain

M. I. Jiménez¹, F. Laguna², F. Solís³ and J. Alvar¹

¹Laboratorio Nacional de Referencia de Leishmaniasis, Servicio de Parasitología, Centro Nacional de Microbiología and ²Servicio de Enfermedades Infecciosas, Centro de Investigaciones Clínicas, Instituto de Salud Carlos III, Madrid, Spain; ³Unidad de Microbiología y Parasitología, Hospital Provincial de Córdoba, Spain

Co-infections with *Leishmania (Leishmania) infantum* and human immunodeficiency virus (HIV) are relatively common in south-west Europe, where both infections overlap. Two-thirds of all visceral leishmaniasis (VL) cases are adults and it is estimated that over 70% of them are associated with HIV co-infection (ALVAR, 1994). Nine different *L. (L.) infantum* zymodemes have so far been identified in patients with leishmaniasis associated with HIV infection: viscerotropic isolates ZM-1 ZM-28, ZM-136 and ZM-183, and dermatotropic isolates ZM-24, ZM-29, ZM-33, ZM-34 and ZM-78 (PORTUS *et al.*, 1989; MARTY *et al.*, 1991; GRAMICCIA *et al.*, 1992; PRATLONG *et al.*, 1993; ALVAR & JIMÉNEZ, 1994). The cutaneous or visceral tropism of *L. (L.) infantum* is determined by its virulence (zymodeme) and the immune cell-mediated response in each case. In co-infected patients, cutaneous zymodemes are frequently isolated from viscera due to the anergy of the patient (JIMÉNEZ *et al.*, 1991; GRADONI & GRAMICCIA, 1994).

Here we report the isoenzyme typing of 5 stocks isolated from co-infected patients, using a panel of 15 isoenzymes and starch gel electrophoresis as previously (MORENO *et al.*, 1986). Five reference strains of *L. (L.) infantum* zymodemes were used: MHOM/FR/78/LEM-75 (MON-1), MHOM/ES/91/BCN-65 (MON-28), MHOM/ES/81/LEM-307 (MON-29), MHOM/ES/82/LEM-356 (MON-33) and MHOM/DZ/83/LEM-425 (MON-80).

Stocks LLM-336, LLM-340 and LLM-382 had unusual electromorph values for glucose phosphate isomerase (GPI) of 115 and malic dehydrogenase (MDH) of 104, which distinguished them from MON-34 (GPI=100, MDH=104). LLM-373 and LLM-175 had the following mobilities: MDH=104, glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH)=105, purine nucleoside phosphorylase 1 (NP1)=140, and GPI=105, the latter of which differs from that of MON-29 (MDH=104, G-6-PDH=105, NP1=140 and GPI=100). The mobilities of the standard strain LEM-75 (MON-1) are all taken as 100. The GPI electromorph patterns are shown in the Figure.

Stocks LLM-373 and LLM-175, both from Madrid, belong to a new enzymatic variant (MAD-501). Stocks LLM-336, LLM-340 and LLM-382 share common isoenzyme characteristics with zymodeme MON-183, recently described from 2 HIV patients from the Valencia area, Spain (PRATLONG *et al.*, 1993). We now confirm the presence of this zymodeme in 3 HIV patients originating from 2 others geographical areas: Andalucía (Jaén, Córdoba) and Madrid, in Spain. Moreover, we report ZM-24 and ZM-34 for the first time in Spain (JIMÉNEZ *et al.*, 1993). These records emphasize the wide range of zymodemes of *L. (L.) infantum* infecting immunodepressed patients.

Acknowledgements

We thank Emilia García for excellent technical assistance. This study was supported by a grant from the Avicenne/EEC Programme (AVI*-CT92-0013).

Reference

- Alvar, J. (1994). Leishmaniasis and AIDS co-infection: the Spanish example. *Parasitology Today*, 10, 160-163.
- Alvar, J. & Jiménez, M. I. (1994). Could infected drug-abusers act as potential *Leishmania infantum* reservoirs? *AIDS*, 8, 834.
- Gradoni, L. & Gramiccia, M. (1994). *Leishmania infantum* tropism: strain genotype or host immune status? *Parasitology Today*, 10, 264-267.
- Gramiccia, M., Gradoni, L. & Troiani, M. (1992). HIV-*Leishmania* co-infections in Italy. Isoenzyme characterization of *Leishmania* causing visceral leishmaniasis in HIV patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 86, 161-163.
- Jiménez, M. I., Gutiérrez-Solar, B., Benito, A., Aguiar, A., García, E., Cercenado, E. & Alvar, J. (1991). Cutaneous *Leishmania (L.) infantum* zymodemes isolated from bone marrow in AIDS patients. *Research and Reviews in Parasitology*, 51, 95-99.
- Jiménez, M. I., Ferrer, M., Cañavate, M., Gutiérrez-Solar, B., García, E., Benito, A. & Alvar, J. (1993). Tipificación isoenzimática de cepas de *Leishmania infantum* aisladas de enfermos inmunocompetentes e inmunosuprimidos. *Acta Parasitologica Portuguesa*, 1, 154.
- Marty, P., Fuzibet, J. G., Pratlong, F., Quinsat, D., Garit-Toussaint, M., Le Fichoux, Y. & Rioux, J. A. (1991). Leishmaniosis viscérale causée par une souche dermatrope de *Leishmania infantum* chez un sidéen. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 84, 365-367.
- Moreno, G., Rioux, J.-A., Lanotte, G., Pratlong, F. & Serres, E. (1986). Le complexe *Leishmania donovani* s.l. Analyse enzymatique et traitement numérique. Individualisation du complexe *Leishmania infantum*. Corollaires biogéographiques et phylétiques. A propos de 146 souches originaires de l'Ancien et du Nouveau Monde. In: *Leishmania. Taxonomie et Phylogénèse. Applications Eco-épidémiologiques*, Rioux, J. A. (editeur). Montpellier: IMEEE, pp. 105-117.
- Portus, M., Gállego, J., Rioux, J.-A., Pratlong, F., Moreno, G., Fisa, R., Gállego, M., Muñoz, C., Riera, C., Sánchez, F. & Serra, T. (1989). Enzymatic heterogeneity among strains of *Leishmania infantum* from human visceral and cutaneous leishmaniasis in Catalonia (Spain). *Revista Iberoica de Parasitología*, 49, 287-289.
- Pratlong, F., Reynes, J., Dereure, J., Baixench, M. E., Marchou, B., Lefebvre, M. & Janbon, F. (1993). Characterization of *Leishmania* isolates from two AIDS patients originating from Valencia, Spain. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 705-706.

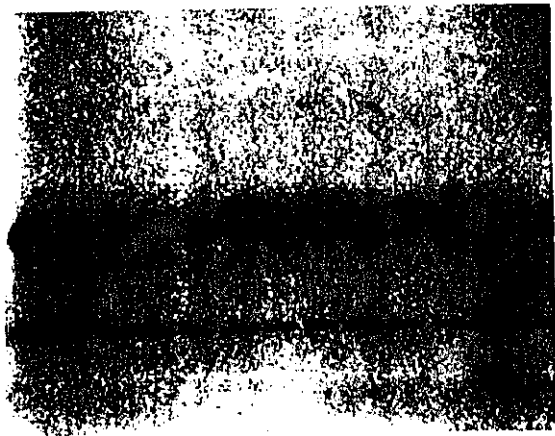


Figure. Glucose phosphate isomerase electrophoretic patterns for reference strains and stocks of *L. (L.) infantum* (zymodeme numbers in parentheses). 1: LEM-75 (MAD-1); 2: LEM-307 (MAD-29); 3: BCN-65 (MAD-28); 4: LEM-356 (MAD-33); 5: LEM-425 (MAD-80); 6: LLM-336 (MAD-183); 7: LEM-75 (MAD-1); 8: LLM-340 (MAD-183); 9: LEM-75 (MAD-1); 10: LLM-373 (MAD-501); 11: LEM-75 (MAD-1); 12: LLM-381 (MAD-183); 13: LLM-175 (MAD-501).

Corresponding zymodemes in the ZM (zymodeme), MON (Montpellier) and MAD (Madrid) series are given the same numbers: e.g., ZM-1=MON-1=MAD-1, etc.

Received 17 March 1994; revised 19 July 1994; accepted for publication 19 July 1994

PLEASE
SIGN